

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA**



**Interação de Novos Compostos de Ruténio Anti-  
tumoraes com Bicamadas Lipídicas: Mecanismos de  
Ação Alternativos em Metalofármacos**

**Telma Cordeiro Santos**

Dissertação

Mestrado em Bioquímica

Área de Especialização: Bioquímica Médica

**(2013)**



**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA**



**Interação de Novos Compostos de Ruténio Anti-tumorais com Bicamadas Lipídicas: Mecanismos de Ação Alternativos em Metalofármacos**

**Telma Cordeiro Santos**

Dissertação

Mestrado em Bioquímica

Área de Especialização: Bioquímica Médica

Orientadores: Doutor Rodrigo de Almeida e Doutora Ana Isabel Tomaz

**(2013)**



## AGRADECIMENTOS

Primeiro quero agradecer aos meus orientadores, Dr. Rodrigo Almeida e Dra. Ana Isabel Tomaz, pela oportunidade que me deram de trabalhar neste projeto e por toda a ajuda, disponibilidade e motivação que me deram, sem dúvida, foram fundamentais para a concretização do trabalho.

Agradeço também, à Dra. Luísa Corvo do Departamento de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica da FFUL, pela sua disponibilidade, simpatia e ajuda na obtenção dos dados de *Dynamic Light Scattering* e de potencial zeta.

À Dra. Suzana Sousa Paiva do Centro de Química Estrutural do IST, pela cedência do seu espectrofluorímetro, no momento crucial do trabalho e quando, infelizmente o nosso aparelho estava parado.

À Professora Dra. Maria Helena Garcia, pelo acolhimento no grupo de Química Organometálica e Biorganometálica e pela disponibilização de todos os recursos dos seus laboratórios. Aos Professores Drs. Carlos Nieto de Castro e Manuel Minas da Piedade, coordenadores do Centro de Ciências Moleculares e Materiais e do Centro de Química e Bioquímica, respetivamente, onde o trabalho de investigação que conduziu a esta tese foi realizado.

Aos colegas de laboratório, tanto de Química Organometálica e Biorganometálica como de Biofísica Molecular e Neural, foram sem dúvida muito importantes, estavam sempre disponíveis para tirar todo o tipo de dúvidas e dar uma ajuda em tudo o que fosse necessário. Um agradecimento de destaque à Cristina que sintetiza os compostos usados nesta tese. Também, não poderia deixar de agradecer à Filipa por me ter aturado e ajudado na fase mais complicada do trabalho, a inicial. Ao Joaquim, André, Andreia, Inês, Ana pelo bom ambiente que dão ao laboratório e às horas de almoço, por todo o companheirismo e disponibilidade para qualquer “urgência”. Sem dúvida tornaram este ano de trabalho bem mais divertido.

Às minhas amigas: Catarina Antunes por estar sempre presente, literalmente, para além da grande amiga que é foi uma excelente colega de laboratório e levou muitas vezes com o meu mau humor e *stress* - desculpa lá qualquer coisinha. À Catarina Almeida e à Inês Coelho pela companhia e incentivo na escrita da tese. À Raquel e a Eva por me acompanharem desde os tempos em que nem imaginava o que queria ser “quando fosse grande”.

Aos meus pais, um grande obrigada, por me tornarem na pessoa que sou hoje. Por todo o amor e por acreditarem em mim. Além de meus pais são os meus melhores amigos e sabem

aconselhar-me e aturar-me como ninguém. Às minhas maninhas, Patrícia e Nadine, que são mais que irmãs, e apenas por existirem já me tornam mais feliz.

Finalmente, mas mesmo nada menos importante, ao Pedro pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos. E por neste ano ter sabido incentivar-me e animar-me nos “dias mais cinzentos”.

# ÍNDICE

Agradecimentos .....	V
Índice de Figuras .....	IX
Índice de Tabelas.....	XII
Principiais Símbolos e Abreviaturas .....	XIII
Resumo.....	XVII
Abstract .....	XIX
1 Introdução .....	1
1.1 Tratamento do cancro com complexos metálicos .....	1
1.2 Complexos de Ruténio .....	2
1.3 Complexos estudados .....	4
1.4 Os lípidos e o cancro .....	7
1.5 Composição das biomembranas .....	9
1.5.1 Glicerofosfolípidos .....	9
1.5.2 Outros lípidos de membrana.....	11
1.6 Organização e estrutura das membranas .....	12
1.7 Caraterização de fases lipídicas.....	13
1.7.1 DOPC e DPPC.....	15
1.8 Sistemas modelo de biomembranas e sondas de membrana .....	17
2 Objetivos .....	21
3 Técnicas Utilizadas .....	25
3.1 Espectroscopia de absorção UV-Visível .....	25
3.2 Espectroscopia de fluorescência .....	26
3.2.1 Espectros de excitação e emissão .....	27
3.2.2 Anisotropia de fluorescência.....	28
3.2.3 Decaimentos de intensidade de fluorescência .....	29
3.3 Determinação do diâmetro médio de LUVs.....	31
3.4 Determinação do potencial zeta de LUVs .....	32
4 Procedimento Experimental .....	35
4.1 Reagentes.....	35
4.2 Material .....	36
4.3 Medidas de fluorescência .....	37
4.3.1 Medidas de fluorescência em estado estacionário.....	37
4.3.2 Medidas de fluorescência em estado transiente .....	39
4.4 Estudos de solubilidade e estabilidade dos compostos .....	41

4.5	Avaliação da fluorescência dos compostos.....	42
4.6	Doseamento de lípidos e sondas .....	42
4.7	Preparação de lipossomas.....	43
4.8	Estudo do efeito do DMSO nas bicamadas lipídicas .....	44
4.9	Preparação de soluções <i>stock</i> dos compostos para adição às LUVs.....	45
4.10	Efeito da bicamada lipídica nas propriedades fluorescentes dos compostos .....	45
4.11	Estudo do efeito dos compostos na bicamada lipídica, através da sonda Di-4-ANEPPS 46	
4.12	Estudo da estabilidade das LUVs na presença dos compostos .....	47
4.13	Efeito dos compostos na permeabilidade da membrana .....	48
4.14	Determinação do coeficiente de partição membrana/água dos compostos .....	50
4.14.1	Determinação do $K_p$ através da fluorescência intrínseca dos compostos .....	50
4.14.2	Determinação do $K_p$ através da fluorescência da sonda Di-4-ANEPPS .....	51
5	Resultados .....	53
5.1	Caraterização da reatividade dos compostos em solução .....	53
5.2	Efeito do DMSO em bicamadas lipídicas de DOPC e DPPC .....	58
5.3	Influência da bicamada lipídica no comportamento dos compostos .....	64
5.3.1	Estudos da fluorescência intrínseca dos compostos na presença de bicamadas.....	64
5.3.2	Estabilidade dos complexos de ruténio na presença de bicamadas lipídicas.....	68
5.4	Efeito dos compostos nas propriedades biofísicas da membrana.....	71
5.4.1	Estudos com a sonda de membrana Di-4-ANEPPS.....	71
5.4.2	Estudo da estabilidade de LUVs na presença dos compostos .....	75
5.4.3	Efeito dos compostos na permeabilidade da membrana .....	78
5.5	Coeficiente de partição membrana/água dos compostos .....	79
6	Discussão .....	83
7	Conclusões e Perspetivas Futuras .....	95
8	Bibliografia .....	99
9	Anexos.....	I
9.1	Principais grupos polares e apolares em lípidos membranares.....	I
9.2	Doseamento Lipídico.....	II
9.3	Estudos de estabilidade dos compostos .....	II
9.4	Espectros de excitação e emissão das sondas de membrana usadas no estudo do efeito do DMSO em bicamadas de DPPC .....	V
9.5	Resultados de <i>Dynamic Light Scattering</i> .....	VI
9.6	Decaimentos de intensidade de fluorescência .....	VII
9.7	Resultados de <i>quenching</i> de fluorescência da sonda Di-4-ANEPPS.....	VII



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Transformação e crescimento celular na formação de um cancro..	1
<b>Figura 2:</b> Representação dos metalofármacos de platina usados no tratamento do cancro: <b>A</b> – Cisplatina; <b>B</b> – Carboplatina; <b>C</b> – Oxaliplatina.	2
<b>Figura 3:</b> Taxa de permuta de ligandos de vários metais em água.	3
<b>Figura 4:</b> Estrutura química dos compostos de ruténio em ensaios clínicos: <b>A</b> – NAMI-A e <b>B</b> – KP1019 [12].	4
<b>Figura 5:</b> Representação da estrutura do complexo OR6.	5
<b>Figura 6:</b> Representação da estrutura dos complexos de Ru(III): <b>A</b> - S8 e <b>B</b> - S10.	6
<b>Figura 7:</b> Representação da diferença entre a terapia lipídica e a quimioterapia convencional.	8
<b>Figura 8:</b> Estrutura geral para as classes de lípidos: <b>A</b> – Glicerofosfolípidos e <b>B</b> – Esfingolípidos.	9
<b>Figura 9:</b> Representação da estrutura dos dois glicerofosfolípidos mais usados neste trabalho: <b>A</b> - 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfocolina (DOPC) e <b>B</b> - 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfocolina (DPPC).	10
<b>Figura 10:</b> Estrutura do colesterol com representação a azul da numeração dos carbonos 3 e 17 onde se ligam o grupo OH e a cadeia acilo, respetivamente.	11
<b>Figura 11:</b> Diagrama esquemático do modelo do mosaico fluído modificado.	13
<b>Figura 12:</b> Representação das conformações: <b>A</b> – Trans; <b>B</b> – Gauche ( $g^+tg^-$ ); <b>C</b> – Duplas cis isolada; <b>D</b> – cis – $tg^-$ .	14
<b>Figura 13:</b> Representação de fases lamelares comuns: <b>A</b> - Fase gel ( $L_\beta$ ); <b>B</b> – Fase fluida ou líquido-desordenado ( $L_\alpha$ ou $L_d$ ); <b>C</b> – Fase líquido – ordenado ( $L_o$ ), a azul estão representadas moléculas de colesterol.	15
<b>Figura 14:</b> Estrutura de uma bicamada de DOPC em fase fluida: <b>A</b> - Obtida por simulação de dinâmica molecular; <b>B</b> – Obtida por difração de raios – X com a bicamada totalmente hidratada.	16
<b>Figura 15:</b> Representação esquemática da estrutura de modelos membranares: <b>A</b> – MLVs; <b>B</b> – LUVs.	18
<b>Figura 16:</b> Representação da estruturas das sondas e da sua localização na membrana	19
<b>Figura 17:</b> Perfil do potencial eletrostático através de uma bicamada lipídica.	20
<b>Figura 18:</b> Representação da disposição das orbitais em complexos metálicos de estrutura octaédrica.	25
<b>Figura 19:</b> Diagrama de Jablonski para fluorescência com efeito da relaxação do solvente em ambientes com polaridades diferentes.	28
<b>Figura 20:</b> Histograma de contagens de fotões ao longo do tempo para obtenção do tempo médio de vida de uma espécie fluorescente	31
<b>Figura 21:</b> Representação esquemática do procedimento usado para a obtenção dos tamanhos de LUVs.	32
<b>Figura 22:</b> <b>A</b> – Potenciais presentes numa partícula em suspensão; <b>B</b> – Célula com um elétrodo em cada extremidade e deslocação das partículas em direção ao elétrodo com carga oposta após aplicação de um campo elétrico; <b>C</b> - Gráfico de flutuações na intensidade da dispersão de luz detetada ao longo do tempo	33
<b>Figura 23:</b> Estudo de estabilidade do complexo S8 em tampão 2	54
<b>Figura 24:</b> Estudo de estabilidade do complexo S10 em tampão 1	55

<b>Figura 25:</b> Estudo de estabilidade do ligando Salan 4-MeO em tampão 1.....	56
<b>Figura 26:</b> Estudo de estabilidade do ligando Salan 4-MeO em tampão 2.....	56
<b>Figura 27:</b> Estudo de estabilidade do ligando Salan 5-MeO em tampão 1.....	56
<b>Figura 28:</b> Estudo de estabilidade do ligando Salan 5-MeO em tampão 2.....	57
<b>Figura 29:</b> Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do DPH em LUVs de DOPC, na ausência de DMSO a preto (controlo) e na presença de 5% DMSO a laranja.....	59
<b>Figura 30:</b> Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do t-PnA em LUVs de DOPC, na ausência de DMSO a preto (controlo) e na presença de 5% DMSO a laranja.....	59
<b>Figura 31:</b> Espectros normalizados de excitação (linha cheias) e emissão (linhas tracejadas) do Di-4-ANEPPS em LUVs de DOPC, na ausência de DMSO a preto (controlo) e na presença de 5% DMSO a laranja.....	60
<b>Figura 32:</b> Efeito de 5% DMSO em LUVs de DOPC: <b>A</b> - Anisotropia de fluorescência em estado estacionário, $\langle r \rangle$ , das diferentes sondas na ausência e presença de DMSO, nos dois tampões; <b>B</b> – Tempo de vida médio de fluorescência, $\langle \tau \rangle$ , das três sondas usadas na ausência e presença de DMSO, nos dois tampões .....	60
<b>Figura 33:</b> Efeito de 5% DMSO em LUVs de DPPC: <b>A</b> - Anisotropia de fluorescência em estado estacionário, $\langle r \rangle$ , das diferentes sondas na ausência e presença de DMSO, nos dois tampões; <b>B</b> – Tempo de vida médio de fluorescência, $\langle \tau \rangle$ , das três sondas usadas na ausência e presença de DMSO, nos dois tampões. ....	61
<b>Figura 34:</b> Efeito do DMSO no potencial de dipolo da membrana .....	64
<b>Figura 35:</b> Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) dos compostos da série I na ausência (controlo - preto) e na presença de LUVs de DOPC com diferentes tempos de incubação do composto (verde – 10 min; azul – 1 h; laranja – 4 h).....	65
<b>Figura 36:</b> Anisotropia de fluorescência em estado estacionário, $\langle r \rangle$ , representada com barras cinzentas riscadas e tempo de vida médio de fluorescência, $\langle \tau \rangle$ , representado com barras pretas, dos compostos da série I na ausência (controlo) e na presença de LUVs de DOPC com diferentes tempos de incubação com o composto.....	66
<b>Figura 37:</b> Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) dos ligandos Salan na ausência (controlo - preto) e na presença de LUVs de DOPC com diferentes tempos de incubação do composto (verde – 10 min; azul – 1 h; laranja – 4 h). ....	67
<b>Figura 38:</b> Anisotropia de fluorescência em estado estacionário, $\langle r \rangle$ , representada com barras cinzentas riscadas e tempo de vida médio de fluorescência, $\langle \tau \rangle$ , representado com barras pretas, dos ligandos Salan na ausência (controlo) e na presença LUVs de DOPC com diferentes tempos de incubação com o composto .....	68
<b>Figura 39:</b> Estudo de estabilidade do complexo OR6, $C_{OR6} = 60 \mu M$ , em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e na presença de LUVs de DOPC.....	69
<b>Figura 40:</b> Estudo de estabilidade do complexo S8, $C_{S8} = 25 \mu M$ , em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) com 2% DMSO e na presença de LUVs de DOPC. ....	69
<b>Figura 41:</b> Estudo de estabilidade do complexo S10, $C_{S10} = 27 \mu M$ , em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) com 2% DMSO e na presença de LUVs de DOPC.....	70
<b>Figura 42:</b> Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do Di-4-ANEPPS em LUVs de DOPC na ausência (controlo – preto) e na presença de compostos da série I (laranja) depois de 1 h de incubação com as LUVs. ....	71

<b>Figura 43:</b> Efeito de compostos da série I no: <b>A</b> - Potencial de dipolo; <b>B</b> – Tempo de vida médio, $\langle\tau\rangle$ , do Di-4-ANEPPS.....	72
<b>Figura 44:</b> Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do Di-4-ANEPPS em LUVs de DOPC na ausência (controle – preto) e na presença de compostos da série II (laranja) depois de 1 h de incubação com as LUVs. ....	73
<b>Figura 45:</b> Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do Di-4-ANEPPS em LUVs de DOPC na ausência (controle – preto) e na presença do ligando PPh <sub>3</sub> . ....	73
<b>Figura 46:</b> Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do Di-4-ANEPPS em LUVs de DOPC na ausência (controle – preto) e na presença de compostos da série II (laranja) depois de 1 h de incubação com as LUVs.. ....	73
<b>Figura 47:</b> Efeito de diferentes compostos da série II no: <b>A</b> - Potencial de dipolo, $R_{ex}$ ; <b>B</b> – Tempo de vida médio, $\langle\tau\rangle$ , do Di-4ANEPPS. ....	74
<b>Figura 48:</b> Valores médios do diâmetro de LUVs com diferentes constituições (DOPC, DPPC e DMPC:DMPG) na ausência (controles) e presença dos compostos da série I. ....	76
<b>Figura 49:</b> Valores médios do diâmetro de LUVs com diferentes constituições (DOPC, DPPC e DMPC:DMPG) na ausência (controles) e presença dos compostos da série II. ....	77
<b>Figura 50:</b> Potencial zeta ( $\zeta$ ) de LUVs de DMPC:DMPG (7:3 mol:mol) na ausência (controles) e presença dos compostos da série I e II. ....	77
<b>Figura 51:</b> Efeito dos diferentes compostos na permeabilidade da membrana, medida através da libertação (leakage) da sonda (5,6)-carboxifluoresceína de LUVs de DOPC.....	78
<b>Figura 52:</b> Intensidade de fluorescência, IF, em LUVs de DOPC com diferentes concentrações de lípido do: <b>A</b> – Ligando pbt; <b>B</b> – Complexo OR6 .....	80
<b>Figura 53:</b> <b>A</b> – Intensidade de fluorescência, IF, em LUVs de DOPC com diferentes concentrações de lípido, do Ligando Salan 4-MeO; <b>B</b> – Constante de Stern-Volmer aparente do complexo S8. ....	80
<b>Figura 54:</b> <b>A</b> – Intensidade de fluorescência, IF, em LUVs de DOPC com diferentes concentrações de lípido, do Ligando Salan; <b>B</b> – Constante de Stern-Volmer aparente do complexo S10. ....	81
<b>Figura 55:</b> Percentagem de cada composto, $X_c$ , que particiona para a fase membrana (LUVs de DOPC) em função da concentração de lípido. ....	82
<b>Figura 56:</b> Simulação de dinâmica molecular de uma bicamada de DOPC a 350 K, com aproximadamente 46 molécula de solvente por molécula de lípido.....	86

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Representação dos valores de $IC_{50} \pm$ desvio padrão (SD) para os complexos em estudo e seus ligandos e para a cisplatina, após 72h em contacto com as linhas celulares humanas.....	7
<b>Tabela 2:</b> Fendas para os compostos fluorescentes e sondas em estado estacionário e transiente para a obtenção de espectros, medidas de anisotropia e decaimentos de intensidade de fluorescência. ....	38
<b>Tabela 3:</b> Comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados em estado estacionário e transiente para as sondas de membrana e compostos em estudo. ....	40
<b>Tabela 4:</b> Tampão usado na preparação das soluções stock dos compostos fluorescentes, percentagem de DMSO e respetiva concentração nas LUVs. ....	46
<b>Tabela 5:</b> Solubilidade à temperatura ambiente dos complexos de Ruténio e dos seus ligandos e precursores (expressa em concentração máxima sem ocorrência de precipitação), em DMSO e nos tampões 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e 2 (Hepes 10 mM pH 7,4_NaCl 150 mM).....	53
<b>Tabela 6:</b> Percentagem de variação (Equação 12) máxima observada para cada composto nos tampões 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e 2 (Hepes 10 mM pH 7,4_NaCl 150 mM); Tempo de incubação usado antes da adição à suspensão de LUVs para cada composto; Comprimentos de onda de excitação e emissão a que corresponde o máximo de intensidade nos espectros dos compostos que apresentam fluorescência intrínseca. A percentagem de DMSO usada foi, para cada composto, a referida na Tabela 5. ....	58
<b>Tabela 7:</b> Sistematização do efeito provocado por 5% DMSO na anisotropia de fluorescência, $\langle r \rangle$ , e no tempo de vida médio, $\langle \tau \rangle$ , das sondas de membrana DPH, t-PnA e Di-4-ANEPPS. ....	62
<b>Tabela 8:</b> Parâmetros de permeabilidade da membrana (% leakage e tempo médio de leakage, $\langle t_l \rangle$ ) ....	79
<b>Tabela 9:</b> Coeficiente de partição ( $K_p$ ) dos complexos de ruténio e dos seus ligandos em bicamadas de DOPC, calculados pelo ajuste da Equação 18 (pbt, OR6 e ligandos Salan) ou Equação 23 (S8 e S10) aos dados experimentais.. ....	81

## PRINCIPAIS SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% v/v	Porcentagem volume/volume
$\bar{\tau}$	Rendimento quântico ponderado pelos tempos de vida de fluorescência
[Ru(bpy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	Bis(2,2' – bipyridina)diclororutênio(II)
[Ru(PPh <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> ]	Dicloro(trifenilfosfina)rutênio(II)
<r>	Anisotropia de fluorescência em estado estacionário
<t <sub>L</sub> >	Tempo médio de <i>leakage</i>
<τ>	Tempo de vida médio de fluorescência
<sup>1</sup> H-NMR	Ressonância magnética nuclear de próton ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
A2780	Linha celular humana do adenocarcinoma do ovário (sensível à cisplatina)
Abs	Absorvência
ADC	Conversor analógico-digital ( <i>Analog-to-Digital Converter</i> )
bpy	2,2'-bipyridina
C	Concentração molar
CF	(5,6)-carboxifluoresceína
CFD	Discriminador de função constante ( <i>Constant Function Discriminator</i> )
D	Coeficiente de difusão
D <sub>H</sub>	Diâmetro hidrodinâmico
Di-4-ANEPPS	4,4-Aminonafetilenilpiridínio
DMPC	1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfocolina
DMPG	1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -3-fosfoglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPC	1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfocolina
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPPC	1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -Glicero-3-fosfocolina
dppz	Dipirido[3,3-a:2',3'-c]–fenazino
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica ( <i>Electron Paramagnetic Resonance</i> )
EtOH	Etanol
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )

G	Fator de correção instrumental
$g^+, g^-$	Conformações <i>gauche</i>
GUVs	Vesículas Unilamelares Gigantes ( <i>Gigant Unilamellar Vesicles</i> )
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperizenoetanosulfônico
HSA	Albumina do soro humano ( <i>Human Serum Albumin</i> )
HT29	Linha celular humana do adenocarcinoma do cólon
IC <sub>50</sub>	Concentração de composto necessária para inibir a proliferação celular em 50%
ICT	Estado de transferência de carga interna ( <i>Internal Charge Transfer</i> )
IF	Intensidade de fluorescência em estado estacionário
IF/IF <sub>max</sub>	Intensidade de fluorescência em estado estacionário normalizada
I <sub>HH</sub>	Componente horizontal da emissão de fluorescência com excitação horizontal
I <sub>HV</sub>	Componente horizontal da emissão de fluorescência com excitação vertical
Im	Imidazolo
Ind	Indazolo
I <sub>VH</sub>	Componente vertical da emissão de fluorescência com excitação horizontal
I <sub>VV</sub>	Componente vertical da emissão de fluorescência com excitação vertical
$k_B$	Constante de Boltzmann
$k_{nr}$	Constante de velocidade de decaimento não radiativo do estado excitado
$K_p$	Coeficiente de partição de um soluto entre uma fase lipídica e aquosa
KP1019	<i>trans</i> -[RuCl <sub>4</sub> (Ind) <sub>2</sub> ]IndH
$k_r$	Constante de velocidade de decaimento radiativo do estado excitado
$K_{SV}$	Constante de <i>Stern-Volmer</i>
L <sub>c</sub>	Fase cristalina
L <sub>d</sub>	Fase líquido desordenado
LE	Estado localmente excitados ( <i>Locally Excited</i> )
LMCT	Transição de carga entre do metal para o ligando ( <i>Ligand to Metal Charge Transfer</i> )
L <sub>o</sub>	Fase líquido ordenado
LUVs	Vesículas Unilamelares Grandes ( <i>Large Unilamellar Vesicles</i> )
L <sub>α</sub>	Fase fluida ou líquida cristalina
XIV	

L <sub>β</sub>	Fase gel
MBP	Proteína básica principal dos eosinófilos ( <i>Major Basic Protein</i> )
MCA	Analizador multicanais ( <i>Multichannel analyzer</i> )
MCF7	Linha celular humana do adenocarcinoma da mama hormono-dependente (com recetores de estrogénio $\alpha$ - ER $\alpha$ (+))
MDAMB231	Linha celular humana do adenocarcinoma da mama invasivo
MeO	Grupo metoxi (OCH <sub>3</sub> )
MeOH	Metanol
MLCT	Transição de carga entre o metal e o ligando ( <i>Metal to Ligand Charge Transfer</i> )
MLVs	Vesículas Multilamelares ( <i>Multilamellar Vesicles</i> )
n $\rightarrow$ $\pi^*$	Um tipo de transição eletrónica
NAMI-A	<i>trans</i> -[RuCl <sub>4</sub> (DMSO)(Im)]ImH
OR6	[Ru(bpy) <sub>2</sub> (pbt)][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ] <sub>2</sub>
PA	Ácido fostatídico
pbt	2-(2-piridil)benzo[b]tiofeno
PC	Fosfatidilcolina
PC3	Linha celular humana do adenocarcinoma da próstata (grau IV), com potencial metastático
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
PPh <sub>3</sub>	Trifenilfosfano
PS	Fosfatidilserina
R	Razão entre intensidades de fluorescência da sonda Di-4-ANEPPS que reportam o valor de potencial de dipolo membranar
S <sub>0</sub>	Estado fundamental singuleto
S <sub>1</sub>	Primeiro estado excitado singuleto
S10	[Ru <sup>III</sup> (5-MeO-Sal-Chan)(PPh <sub>3</sub> )Cl]
S <sub>2</sub>	Segundo estado excitado singuleto
S8	[Ru <sup>III</sup> (4-MeO-Sal-Chan)(PPh <sub>3</sub> )Cl]
Salan 4-MeO	4-MeO-Sal-Chan
Salan 5-MeO	5-MeO-Sal-Chan
Salan	N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bis - aminofenolato
Salen	bis(salicilaldeído)etilenodiimina

SD	Desvio padrão
SM	Esfingomielina
<i>sn</i>	Numeração estereoespecífica ( <i>Stereospecific Numbering</i> )
SPT	Cronometragem de fóton único ( <i>Single Photon Timing</i> )
SUVs	Vesículas Unilamelares Pequenas ( <i>Small Unilamellar vesicles</i> )
<i>t</i>	Conformação <i>trans</i>
T	Temperatura (°C)
TAC	Conversor de tempo-amplitude ( <i>Time-to-amplitude converter</i> )
TCSPC	Cronometragem de fóton único (expressão equivalente a SPT; <i>Time Correlated Single Photon Counting</i> )
$T_m$	Temperatura de transição principal ( <i>melting temperature</i> )
<i>t</i> -PnA	Ácido <i>trans</i> -parinárico
UV-Vis	Ultravioleta-visível
$V_m$	Volume ocupado pela fase lipídica (membrana).
$x_c$	Fração de composto na membrana
$\alpha_i$	Fator pré-exponencial da componente i do decaimento de intensidade de fluorescência do fluoróforo
$\lambda_{em}$	Comprimento de onda de emissão (nm)
$\lambda_{ex}$	Comprimento de onda de excitação (nm)
$\pi \rightarrow \pi^*$	Um tipo de transição eletrônica
$\tau_i$	Tempo de vida de fluorescência da componente i



## RESUMO

Os lípidos de membrana desempenham um papel ativo importante em processos celulares, como iniciação de cascatas de sinalização e tráfego intracelular, mas só recentemente foi reconhecido o seu potencial como alvo terapêutico.

Os complexos de rutênio (Ru) apresentam uma alternativa promissora aos fármacos de platina, pelas menor citotoxicidade e maior seletividade, e o seu mecanismo de ação é intensamente estudado atualmente.

Interligando estas duas áreas, o interesse desta tese é perceber o papel que a membrana pode ter no mecanismo de ação destes compostos. Foram estudados três complexos, um de Ru(II), OR6, e dois de Ru(III), S8 e S10. Como modelo membranar usaram-se, principalmente, bicamadas lipídicas em suspensão (lipossomas) de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC).

Os resultados mostraram que os três complexos interagem com os lipossomas, embora tenham uma preferência pela membrana e pelo local onde se inserem diferentes. O complexo OR6 foi o que teve uma interação maior com a bicamada, apresentando um valor de coeficiente de partição membrana/água,  $K_p$ , de  $(113 \pm 48) \times 10^4$ , e uma localização no interior da bicamada. Para os complexos S8 e S10 foram obtidos valores de  $K_p$  inferiores,  $(0,8 \pm 0,5) \times 10^4$  e  $(1,4 \pm 0,5) \times 10^4$ , respectivamente, localizando-se mais próximo da interface fosfolípido/água. Além disso concluiu-se que a interação dos compostos com a bicamada é impulsionada pelos seus ligandos. Os três complexos aumentam a permeabilidade da membrana, sem no entanto comprometer a integridade dos lipossomas. No complexo OR6 a coordenação dos ligandos ao centro metálico aumenta marcadamente o *leakage*, enquanto nos complexos S8 e S10 o aumento da permeabilidade membranar corresponde a um efeito médio dos seus ligandos.

No conjunto, os resultados, mostram que os lípidos membranares poderão estar envolvidos no mecanismo de ação destes compostos, sendo proposto que o aumento da permeabilidade da membrana seja importante no seu modo de ação.

**PALAVRAS - CHAVE:** Complexos de Rutênio; terapia do cancro; fosfolípidos; biofísica de membranas; espectroscopia de fluorescência.



## ABSTRACT

Membrane lipids play active roles in crucial cellular processes, such as initiation of signaling cascades and intracellular trafficking. However, their potential as therapeutic targets has only recently been advocated.

Due to their lower cytotoxicity and higher selectivity, Ruthenium (Ru) complexes are a promising alternative to platinum-based complexes, and their mechanism of action is currently subject of intense research.

Combining these two fields, this Thesis aims to unravel a possible of the cell membrane in the mechanism of action of these compounds. In this work three Ru complexes were studied: one of Ru(II), OR6, and two of Ru(III), S8 and S10. As model system, lipid bilayers in suspension (liposomes) composed of dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) were mainly employed.

The results showed that all three complexes interact with liposomes, however distinct membrane preference and insertion depth were detected. OR6 complex exhibited the strongest interaction, with a membrane/water partition coefficient,  $K_p$ , of  $(113 \pm 48) \times 10^4$ , and preferential location within the bilayer core. S8 and S10 complexes have lower  $K_p$  values,  $(0.8 \pm 0.5) \times 10^4$  and  $(1.4 \pm 0.5) \times 10^4$ , respectively, and their membrane location is closer to the phospholipid/water interface. Furthermore, it was observed that the interaction of the compounds with the bilayer is driven by their ligands. All the three complexes increase membrane permeability, yet without compromising the integrity of the liposomes. The coordination of the ligands to the Ru metal center in OR6 leads to a pronounced increase in membrane leakage, while for S8 and S10 complexes the increased membrane permeability corresponds to an average effect of their ligands.

Altogether, the results obtained suggest that membrane lipids can be involved in the mechanism of action of these compounds, and the increase in membrane permeability is proposed as being an important process in their mode of action.

**KEYWORDS:** Ruthenium complexes; cancer therapy; phospholipids; biophysics of membranes; fluorescence spectroscopy.





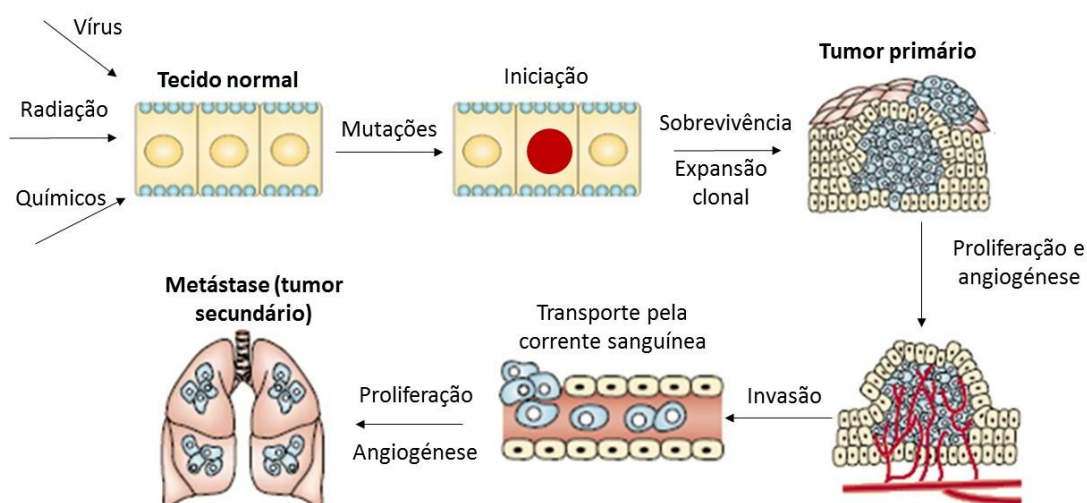


# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Tratamento do cancro com complexos metálicos

Cerca de 7,6 milhões de todas as mortes no mundo em 2008 foram causadas por cancro e estima-se que este número continue a subir, atingindo-se em 2030 13,1 milhões de mortes [1].

Em tecidos normais a taxa de crescimento de novas células e morte celular por apoptose são mantidas em equilíbrio, mas em tumores malignos (ou cancro) este equilíbrio é quebrado e há um crescimento descontrolado de células. Tudo começa com alterações genómicas na “célula cancerígena”, sendo o desenvolvimento do tumor promovido pela sobrevivência e expansão clonal dessas células. A progressão do tumor engloba um crescimento substancial no tamanho do tumor primário (tumor no local onde teve origem), podendo culminar no aparecimento de tumores secundários através da migração de células cancerígenas do tumor primário – metástases. Para o crescimento tumoral e metástases a angiogénese (crescimento de novos vasos sanguíneos) é um processo crucial. A Figura 1 representa os principais processos envolvidos na progressão de um tumor maligno [2,3].

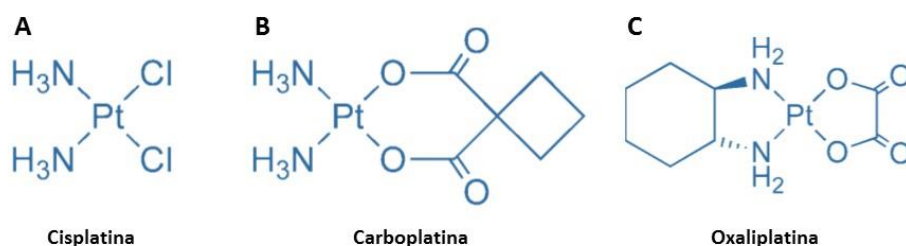


**Figura 1:** Transformação e crescimento celular na formação de um cancro. Para o seu desenvolvimento, as células cancerígenas adquirem seis propriedades fundamentais: Proliferação auto-suficiente, insensibilidade a sinais anti proliferativos, resistência à apoptose, potencial replicativo ilimitado, conservação da vascularização, capacidade de invasão e metastatização. Na figura representa-se um tumor secundário no pulmão, como exemplo (adaptado de [2]).

A descoberta acidental da cisplatina (Figura 2 A) por Rosenberg e pelos seus colaboradores abriu caminho para o desenvolvimento da quimioterapia à base de metalofármacos. A cisplatina é, sem dúvida, o metalofármaco usado no tratamento do cancro de maior sucesso até à data. O seu modo de ação está bem estudado, sabe-se que depois de entrar na célula a cisplatina é

hidrolisada e o seu centro metálico de Platina(II) (Pt(II)) se liga ao DNA irreversivelmente, causando uma distorção significativa na estrutura do DNA. Tal resulta numa incapacidade de replicação que acaba por culminar na apoptose celular [4–7]. No entanto, não deixa de ter desvantagens: tem elevada toxicidade geral levando a efeitos secundários indesejáveis (por exemplo toxicidade gastrointestinal, náuseas, vômitos), é inativa contra metástases e os maiores problemas são que alguns tipos de cancro têm resistência intrínseca e outros adquirem resistência durante o tratamento [6,7].

Os efeitos indesejáveis da cisplatina levaram ao desenvolvimento de novos compostos de platina que fossem menos tóxicos (2ª geração). A carboplatina (Figura 2 B) e a oxaliplatina (Figura 2 C) são dois desses compostos. O primeiro tem menos efeitos secundários e é mais fácil de usar em terapias combinadas. O segundo tem a vantagem de ter um espectro de ação diferente (é ativo contra o cancro colorectal que não era tratado pela cisplatina ou carboplatina) e além disso é efetivo no tratamento de alguns cancros resistentes à cisplatina. Apesar das melhorias, estes complexos<sup>1</sup> continuam a ter o problema da resistência adquirida [5,8].



**Figura 2:** Representação dos metalofármacos de platina usados no tratamento do cancro: **A** – Cisplatina; **B** – Carboplatina; **C** – Oxaliplatina (adaptado de [6]).

Os complexos de platina em uso clínico mundial (cisplatina, carboplatina e oxoplatina) são ainda hoje usados em cerca de 50 – 70% dos casos de cancro, usualmente combinados com outros fármacos [8]. No entanto as desvantagens que estes apresentam têm estimulado a pesquisa de novos anticancerígenos com outros centros metálicos, nomeadamente o ruténio (Ru).

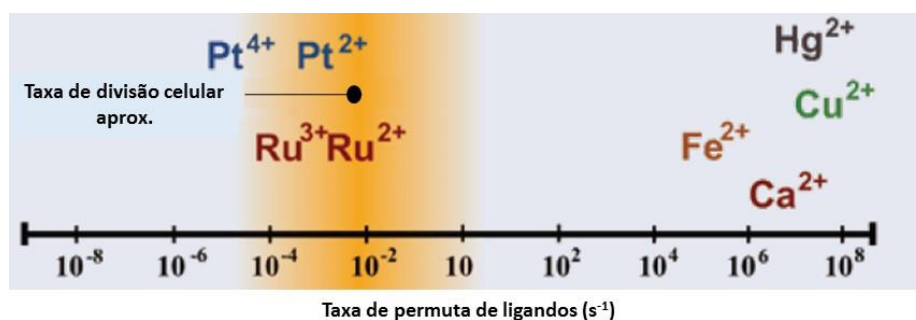
## 1.2 Complexos de Ruténio

Os complexos de ruténio são atualmente reconhecidos como uma alternativa promissora aos complexos de platina. Há vários benefícios de explorar o ruténio ao invés da platina, por

<sup>1</sup> Designa-se por “complexo de coordenação” ou simplesmente por “complexo” uma entidade química composta por um ião metálico e seu(s) ligando(s). Num complexo de coordenação, um átomo central (tipicamente um catião metálico) está ligado por ligações covalentes dativas a uma ou mais moléculas (os ligandos). Estes atuam como doadores de pares de eletrões e têm existência independente – isto é, podem dissociar-se do complexo de coordenação original, por permuta com outro ligando ou molécula de solvente (ex. água, ião hidroxilo).



exemplo: i) a possibilidade de usar um grande número de ligandos com uma cinética de permuta relativamente baixa em água – a sua cinética está na escala de tempo da reprodução celular (mitose) o que significa que se o ruténio estabelecer uma interação com qualquer componente celular, permanece ligado durante o tempo de vida da célula (Figura 3); ii) a geometria de coordenação octaédrica em contraste com a geometria quadrangular-plana dos complexos de Pt(II), implicando uma reatividade e modo de ação diferente; iii) a acessibilidade biológica a diferentes estados de oxidação (+2, +3 e +4), propriedade importante uma vez que a sua atividade anti-tumoral pode estar dependente do seu estado de oxidação; iv) e a capacidade do ruténio em mimetizar a ligação do ferro às biomoléculas [9–11].

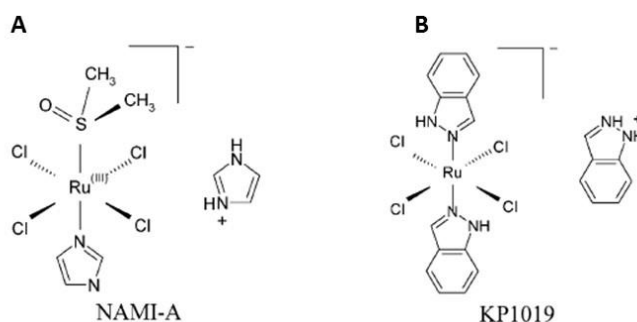


**Figura 3:** Taxa de permuta de ligandos de vários metais em água. O ruténio tem uma taxa relativamente lenta comparativamente à taxa de divisão celular. Pt – Platina; Ru – Ruténio; Fe – Ferro; Ca – Cálcio; Hg – Mercúrio; Cu – Cobre (adaptado de [11]).

De facto os complexos de ruténio oferecem diferentes mecanismos de ação (parecem ter mais do que um alvo biológico e o mecanismo de ação pode resultar do efeito combinado das várias respostas biológicas), um diferente espectro de atividade e menor toxicidade que os metalofármacos de Pt, o que pode ser explicado em parte pela capacidade de ligação do ruténio a moléculas biológicas, como a albumina e transferrina. O mecanismo de “ativação por redução” pode também ser responsável pela menor toxicidade dos metalofármacos contendo ruténio [9,10]. Este mecanismo propõe a redução do Ru(III) a espécies cineticamente mais ativas de Ru(II) no ambiente de hipoxia (baixo teor de oxigénio) de tumores sólidos. Este ambiente redutor surge em tumores de crescimento rápido por causa da insuficiente formação de vasos sanguíneos. O baixo teor em oxigénio, juntamente com o baixo pH extracelular e a presença de uma quantidade apreciável de espécies redutoras (como o glutatono reduzido), fornecem condições favoráveis para a redução seletiva (uma vez que células normais não se encontram em hipoxia) de fármacos com potencial *redox* Ru(III)/Ru(II). A capacidade de redução depende muito dos ligandos usados, e um conhecimento do comportamento dos ligandos, como a extensão da doação de eletrões para o metal, permite prever o potencial *redox* do fármaco e prepará-los de acordo com os parâmetros *redox* desejados. No entanto há que ter em conta que

os complexos de Ru(III) podem sofrer hidrólise ou ligar-se a proteínas antes da redução, o que altera as suas propriedades *redox* [9,10,12]. Apesar das suposições e investigação ativa acerca dos mecanismos de ação dos compostos de Ru, ainda muito se encontra por estudar.

Os primeiros compostos de rutênio a entrarem em ensaios clínicos foram o NAMI-A (*trans*-[RuCl<sub>4</sub>(DMSO)(Im)]ImH, onde Im é imidazolo) e KP1019 (*trans*-[RuCl<sub>4</sub>(Ind)<sub>2</sub>]IndH, onde Ind é indazolo) (Figura 4 A e B, respetivamente). Os dois já completaram com sucesso a fase I dos ensaios clínicos e encontram-se, atualmente, na fase II [10,12,13].



**Figura 4:** Estrutura química dos compostos de rutênio em ensaios clínicos: **A** – NAMI-A e **B** – KP1019 [12].

O NAMI-A não é muito ativo contra tumores sólidos primários, no entanto é um potente agente contra metástases. Esta característica é bastante importante porque, apesar de terem sido feitos muitos avanços no tratamento de tumores primários (como remoção por cirurgia, quimioterapia e radioterapia) as metástases continuam a representar um enorme desafio no tratamento do cancro e, mais do que os tumores primários, são a principal causa de morte no cancro. A atividade citotóxica contra metástases do NAMI-A parece estar relacionada principalmente com o seu potencial anti-angiogénico, mas também com modificações ao nível do citoesqueleto e alterações da capacidade de adesão celular [10,12,13].

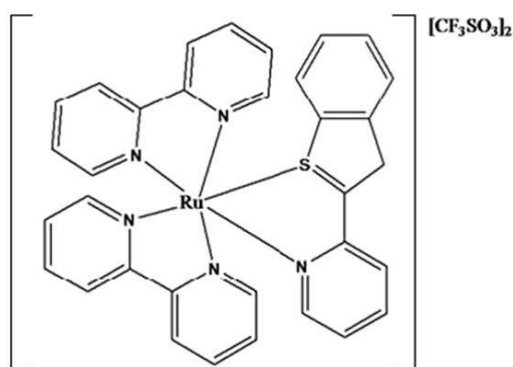
O segundo complexo, KP1019, é bastante ativo contra tumores primários. Acredita-se que o composto é transportado pela transferrina até às células, depois é libertado pela proteína em ambientes de pH ácido, como o dos endossomas, causando apoptose pela via mitocondrial. Para além disso, este complexo demonstra uma toxicidade praticamente inexistente nos ensaios clínicos até agora realizados [10,12,13].

### 1.3 Complexos estudados

Os dois complexos de rutênio que já entraram em ensaios clínicos, Figura 4, são de Ru(III) e pensa-se que o mecanismo de ação de complexos deste tipo possa envolver a redução a compostos de Ru(II), mais ativos. Isto fez com que o interesse pelas potencialidades anti-tumorais dos complexos de Ru(II) fosse aumentando [14]. O efeito anti-tumoral de complexos parece estar relacionado quer com a identidade e estado de oxidação do ião metálico quer com

a identidade dos seus ligandos. O efeito global do complexo é, tipicamente, a combinação do efeito sinérgico do metal e do(s) seu(s) ligando(s). O NAMI-A e o KP1019 são muito suscetíveis de sofrer hidrólise em solução aquosa (perdendo facilmente os seus iões cloreto) e têm problemas de baixa solubilidade

Neste trabalho estudaram-se complexos de Ru(II) e de Ru(III) com uma solubilidade e estabilidade em solução aquosa adequadas e que já mostraram atividade contra células tumorais. Em concreto, estudou-se, um complexo octaédrico de Ru(II) -  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pbt})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$  – aqui chamado de OR6 (Figura 5), sendo também estudados os seus ligandos pbt (2-(2-piridil)benzo[b]tiofeno) e *bpy* (2,2 – bipyridina). O precursor deste complexo é o  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ , que também foi alvo de estudos iniciais nesta tese. Ao longo da tese o conjunto destes compostos irá ser referido como série I.



**Figura 5:** Representação da estrutura do complexo OR6 (adaptado de [15]).

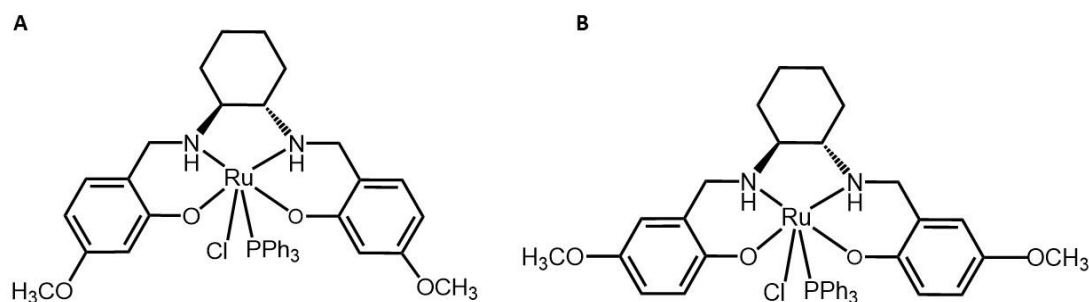
A citotoxicidade destes complexos foi avaliada em linhas tumorais humanas de carcinoma do ovário, mama, cólon e próstata (A2780, MCF7, HT29 e PC3 respetivamente) através do valor da concentração do composto que inibe em 50% o crescimento das células tumorais ( $\text{IC}_{50}$ ), depois de 72h de exposição das células ao composto [15]. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  estão resumidos na Tabela 1, observando-se que os valores variam consoante a linha celular, mas são sempre menores para o complexo (OR6) do que para o seu ligando livre (pbt). Observa-se, também, que o OR6 é bastante mais citotóxico para as linhas celulares do cancro da mama (MCF7) e da próstata (PC3), os tipos de cancro mais frequentes em mulheres e homens, respetivamente, e resistentes ao tratamento com cisplatina [1,15].

Recentemente, tem crescido o interesse em ligandos que contenham átomos doadores do tipo (O,N), (O,S), (N,S) e (S,S). Os ligandos “Salen”<sup>2</sup> tetradentados  $\text{N}_2\text{O}_2$  são de fácil preparação, no entanto são suscetíveis de sofrer hidrólise em meios aquosos. A variante com a ligação imina

<sup>2</sup> “Salen” é a designação abreviada de um ligando obtido por condensação do salicilaldeído com uma diamina.

reduzida a amina dá origem a ligandos tetradentados bis(aminofenolato), também conhecidos por “Salan”. Estes ligandos oferecem maior flexibilidade mantendo os doadores  $N_2O_2$ , sendo assim bastante atrativo para a síntese de compostos de rutênio com maior estabilidade. Além disso, o oxigênio fenolato é um doador forte e por isso é previsível que estabilize o estado de oxidação 3+ do Rutênio [16].

Neste trabalho foram estudados dois complexos octaédricos de Ru(III) com ligandos do tipo Salan de fórmula geral  $[Ru^{III}(L)(PPh_3)Cl]$ , onde L é um ligando. Os complexos usados tinham o ligando 4-MeO-Sal-Chan (nesta tese irá ser referido como Salan 4-MeO ou apenas 4-MeO) cuja coordenação ao centro metálico origina um complexo simplificadaamente chamado nesta tese de **S8**, e o ligando 5-MeO-Sal-Chan (Salan 5-MeO ou 5-MeO) dando origem ao complexo designado por **S10** [16]. Na Figura 6 podem observar-se as estruturas dos dois complexos, conseguindo ver-se que a única diferença entre eles é a posição do grupo metoxi (MeO). No complexo S8 o grupo MeO está em posição *meta* relativamente ao grupo fenolato e no complexo S10 na posição *para* [16]. Também se fizeram alguns estudos com o precursor destes complexos,  $[Ru(PPh_3)_3Cl_2]$  e com o trifenilfosfano ( $PPh_3$ ). Estes compostos podem, ao longo do texto, aparecer referenciados como série II.



**Figura 6:** Representação da estrutura dos complexos de Ru(III): **A** - S8 e **B** - S10 no complexo S8 o grupo R ( $OCH_3$ ) esse grupo está na posição 3 (4-MeO) e no complexo S10 na posição 4 (5-MeO) (adaptado de [16]).

A citotoxicidade dos complexos e dos seus ligandos foi avaliada através do seu valor de  $IC_{50}$  para linhas celulares de carcinomas do ovário (A2780) e da mama não invasivo e invasivo (MCF7 e MDAMB231, respetivamente), estando os valores mais uma vez na Tabela 1. Tanto os ligandos como os complexos exibem efeitos anti-proliferativos nas três linhas celulares, embora sejam menos pronunciados na linha celular MDAMB231. Os resultados mostram que a coordenação dos ligandos ao centro metálico de rutênio aumenta a sua atividade citotóxica, apresentando valores da mesma magnitude que a cisplatina para a linha celular A2780 e valores mais baixos que a cisplatina para a linha celular MCF7. Os resultados indicam, ainda, que os complexos têm potencial citotóxico para o carcinoma da mama, embora os resultados com a linha celular MDAMB231 invasiva sugiram que estes têm pouco potencial anti-metastático [16].

**Tabela 1:** Representação dos valores de  $IC_{50} \pm$  desvio padrão (SD) para os complexos em estudo e seus ligandos e para a cisplatina, após 72h em contacto com as linhas celulares humanas. A citotoxicidade foi avaliada para as linhas celulares do cancro do ovário (A2780), da mama não invasivo (MCF7), da mama invasivo (MDAMB231), do cólon (HT29) e da próstata (PC3) [15,16].

Composto	$IC_{50}$ (uM) $\pm$ SD (72h)				
	A2780 <sup>a</sup>	MCF7 <sup>b</sup>	MDAMB231 <sup>c</sup>	HT29	PC3 <sup>d</sup>
pbt	126 $\pm$ 13	217 $\pm$ 46		393 $\pm$ 81	
OR6	4,1 $\pm$ 1,1	5,9 $\pm$ 1,1		27 $\pm$ 6	9,2 $\pm$ 1,7
Salan 4-MeO	12 $\pm$ 3,2	22 $\pm$ 5,5	57,3 $\pm$ 21		
S8	3,3 $\pm$ 0,9	8,5 $\pm$ 0,9	27,4 $\pm$ 12		
Salan 5-MeO	6,9 $\pm$ 2,1	7,8 $\pm$ 1,9	52,7 $\pm$ 15		
S10	4,4 $\pm$ 1,8	3,9 $\pm$ 0,8	13,6 $\pm$ 55		
Cisplatina	2,5 $\pm$ 0,1	28 $\pm$ 6	39 $\pm$ 5,0	7,0 $\pm$ 2,0	51 $\pm$ 7,0

**a** – Linha celular sensível à cisplatina; **b** – Linha hormono-dependente com recetores estrogénio  $\alpha$  ( $ER_{\alpha}(+)$ ); **c** – Linha com grande potencial metastático; **d** – Linha celular resistente à cisplatina, com potencial metastático (adenocarcinoma da próstata grau IV).

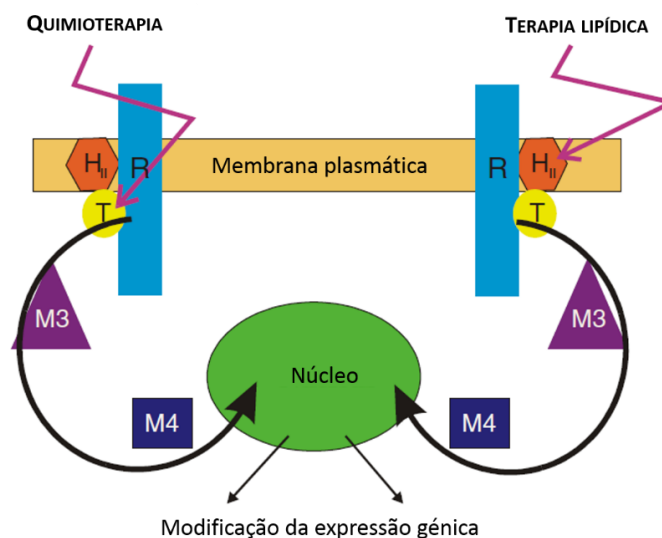
Para o complexo OR6 já foram realizados estudos de interação com o DNA de onde se conclui que há a formação do aducto {DNA-OR6}. Este estudo sugere que o OR6 interage com o DNA através de intercalação (inserção do composto entre os pares de bases). No entanto, chamam a atenção para a possibilidade de este poder não ser o único alvo do OR6 [15]. Também para os complexos S8 e S10 existe um estudo, bastante recente, de interação com o DNA. Nesse estudo concluiu-se que ambos os complexos se podem ligar ao DNA com grande afinidade e que o mecanismo dessa interação será por intercalação [17]. Para estes complexos foi ainda estudada a interação com a albumina (HSA), sendo que os resultados sugeriram que ambos os complexos se ligam moderadamente a esta proteína podendo assim o seu transporte na corrente sanguínea ser realizado através da HSA [16].

## 1.4 Os lípidos e o cancro

Anteriormente os lípidos eram vistos apenas como um mero suporte para a associação transitória ou permanente de proteínas, sendo os processos biológicos associados com a atividade proteica. No entanto hoje sabe-se que os lípidos da membrana podem regular diversos processos celulares, como iniciação de cascatas de sinalização, tráfego e sinalização celular. Sabe-se também que a simples organização lipídica pode determinar a localização e atividade de proteínas na membrana, dando resultado a uma mudança das vias de sinalização, podendo induzir, por exemplo, apoptose e paragem do ciclo celular [18–20].

Têm sido descritas mudanças nos níveis de lípidos em várias patologias, nomeadamente o cancro. Por exemplo, uma diminuição dos níveis de esfingomielina tem sido observada no

cancro do colon, mama, leucemia e cérebro [21]; maiores níveis de ácido oleico foram detetados nos cancros da mama, ovário, colon e próstata [22,23]; concentrações anormais de fostatidilcolinas foram observadas em células do cancro do ovário [24]; acumulação de colesterol no cancro da próstata [25]. Para além disso tem sido descrito que linhas cancerígenas resistentes à quimioterapia também apresentam modificações lipídicas, como elevados níveis de colesterol [26].



**Figura 7:** Representação da diferença entre a terapia lipídica e a quimioterapia convencional. Sinais extracelulares são propagados até aos recetores (R) ou transdutores (T) que regulam a produção de segundos mensageiros, capazes de regular terceiros (M3) e quartos (M4) mensageiros. Estes sinais resultam em respostas citosólicas e modulação da expressão génica. Em muitas situações tumorais estas cascatas de sinalização estão alteradas. Na quimioterapia convencional o alvo dos fármacos é a regulação de uma proteína, normalmente um recetor (R). Na terapia lipídica o alvo são os lípidos de membrana (no caso da figura o alvo foi um domínio membranar não lamelar (ver secção 1.8) – H<sub>II</sub>) (adaptado de [20]).

Estes resultados salientam a importância da membrana plasmática como alvo terapêutico (*membrane-lipid therapy*). A terapia lipídica é recente e tem como objetivo desenvolver fármacos que regulem a composição e/ou estrutura lipídica das membranas, podendo ser o efeito final do fármaco a modulação da atividade de uma proteína e/ou os mecanismos de sinalização a ela associado culminando, no final na eliminação do tumor por apoptose (Figura 7). Sabe-se que alterações nas propriedades da membrana, como fluidez e permeabilidade, podem também ter um efeito terapêutico. Por outro lado, dadas as alterações lipídicas observadas em pacientes com cancro, uma terapia tendo como alvo a membrana pode aumentar a seletividade dos fármacos para células cancerígenas e, como tal, diminuir a sua toxicidade [20,27,28].

## 1.5 Composição das biomembranas

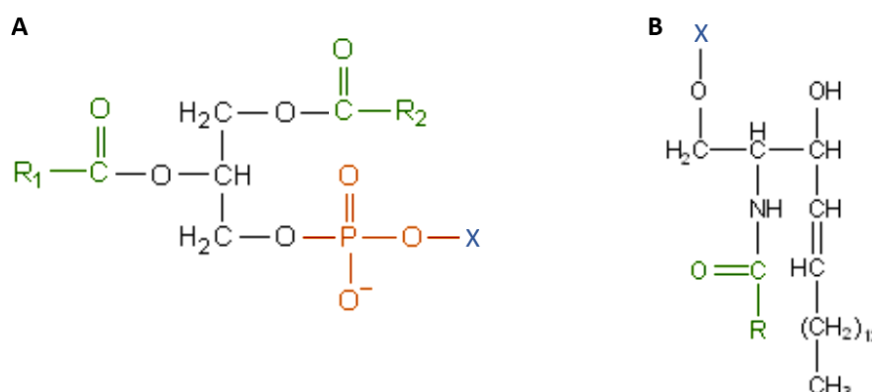
As membranas são componentes essenciais de todas as células, quer de seres eucariotas quer de procariotas, e os seus componentes principais são os lípidos e as proteínas. Podem também existir glícidos, mas sempre na forma de glicolípidos ou glicoproteínas [29,30].

As membranas são cruciais na medida em que definem os limites interno e externo de uma célula e controlam todo o tipo de interações entre o interior e exterior. Nos seres eucariotas são também responsáveis pela organização do espaço interno em diferentes organelos onde certas atividades podem ocorrer com maior eficiência. Como já referido, sabe-se que a organização e estrutura dos lípidos de membrana tem um papel importante em diversos processos biológicos [19,29,30].

Uma única membrana pode possuir mais de 100 lípidos distintos na sua composição e cada membrana tem uma composição lipídica distinta que está intimamente relacionada com o seu papel biológico [29]. A definição de lípido é muitas vezes controversa, a *European Lipidomics Initiative* define lípidos como pequenas moléculas hidrófobas ou anfipáticas que podem ser inteiramente ou em parte originadas por condensações de tioésteres ou de unidades isopreno. São definidas oito classes principais de lípidos, mas aqui apenas serão apresentados os principais tipos de lípidos existentes nas membranas biológicas de eucariotas [31]. Estes podem ser divididos em quatro grandes classes: glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteróis e glicolípidos.

### 1.5.1 Glicerofosfolípidos

Os glicerofosfolípidos (também chamados fosfolípidos) são os lípidos mais comuns nas células. A Figura 8 A mostra uma representação da estrutura geral dos glicerofosfolípidos.

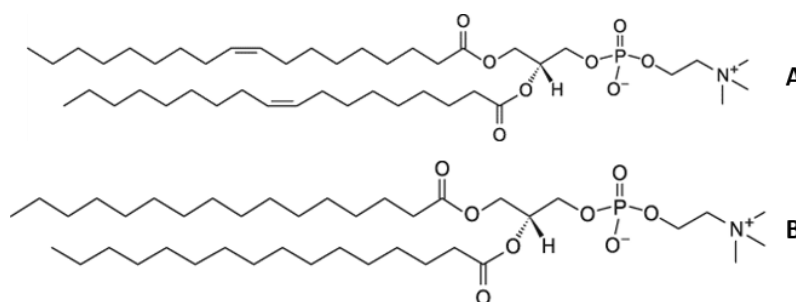


**Figura 8:** Estrutura geral para as classes de lípidos: **A** – Glicerofosfolípidos e **B** – Esfingolípidos. A preto estão os esqueletos das estruturas **A** – Glicerol e **B** – Esfingosina; a verde estão representados os ácidos gordos; a laranja o grupo fosfato; a azul está representado o grupo X (Tabela A. 2), grupo polar de ambas as classes de lípido (adaptado de [32]).

Estes lípidos são compostos por uma molécula de glicerol (preto) esterificada nas posições *sn*-1 e *sn*-2 (numeração estereoespecífica) por ácidos gordos (verde) e na posição *sn*-3 por um grupo fosfato (laranja) [18,29,31].

Os ácidos gordos ( $R_1COOH$  e  $R_2COOH$ ) constituem a parte apolar ou hidrófoba dos glicerofosfolípidos, podendo ter diferentes comprimentos e diferentes graus de insaturação. Os ácidos gordos insaturados têm uma ou mais ligações duplas, que podem estar na configuração *cis* e *trans*. Nas insaturações naturais as ligações duplas ocorrem invariavelmente na configuração *cis* e estão sempre separados por um grupo  $CH_2$ . A presença de uma dupla ligação num ácido gordo, afeta drasticamente a estrutura da membrana [29,32,33]. Em anexo, Tabela A. 1, estão apresentados alguns dos ácidos gordos mais comuns nas membranas eucariotas.

O grupo X representa a cabeça polar ou hidrófila destes lípidos, e pode ser de vários tipos (Tabela A. 2 - anexo). A carga deste grupo pode ser nula ou positiva, originando glicerofosfolípidos a pH fisiológicos carregados negativamente ou zwitteriônicos, respetivamente. Esta característica é importante para a interação e ligação de fármacos e proteínas aos lípidos de membrana. Apesar da grande variedade na composição das membranas celulares animais, a fosfatidilcolina (PC) e a fosfatidiletanolamina (PE) constituem as classes de fosfolípidos mais comuns [18,29,31].



**Figura 9:** Representação da estrutura dos dois glicerofosfolípidos mais usados neste trabalho: **A** - 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-fosfocolina (DOPC) e **B** - 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-fosfocolina (DPPC) (adaptado de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com) – acedido a 8 de Agosto de 2013).

Neste trabalho foram, principalmente, usados dois glicerofosfolípidos, 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-fosfocolina (DOPC) e 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-fosfocolina (DPPC), representados na figura anterior (Figura 9) por A e B respetivamente. Nos fosfolípidos naturais as cadeias acilo saturadas são usualmente esterificadas na posição *sn*-1, enquanto as insaturadas na *sn*-2, sendo esta assimetria importante para a fluidez e curvatura das membranas [34]. Apesar dos dois lípidos artificiais usados neste trabalho não apresentarem as propriedades acima referida, foram usados uma vez que são lípidos bem caracterizados na literatura, com temperaturas de transição de fase principal conhecidas ( $T_m$  – secção 1.7). Além disso obter um modelo membranar na fase



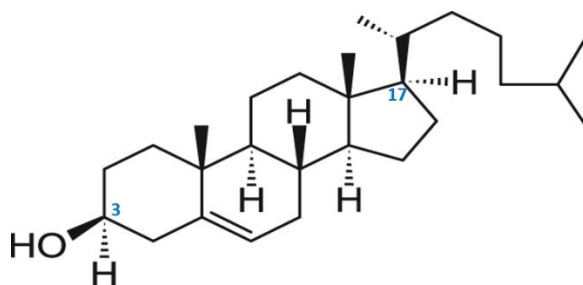
gel à temperatura ambiente é mais fácil num lípido com as duas cadeias saturadas (DPPC). Algumas características mais específicas destes dois lípidos irão ser referidas na secção 1.7.1.

### 1.5.2 Outros lípidos de membrana

Outros lípidos de membrana, não usados nesta tese mas que têm papéis importantes são os esfingolípidos os esteróis e os glicolípidos.

Os esfingolípidos contêm uma ceramida como grupo hidrófobo sendo esta a única diferença genérica relativamente aos glicerofosfolípidos. A ceramida é uma molécula que resulta da condensação de um ácido gordo de cadeia longa com uma amina de longa cadeia alifática. O grupo X é do mesmo tipo que os glicerofosfolípidos, no entanto nas membranas de eucariotas os esfingolípidos possuem em geral cadeias acilo mais longas e com menor número de insaturações, o que lhes confere uma  $T_m$  mais elevada e consequentemente uma maior tendência para formar domínios ordenados à temperatura fisiológica. Na membrana plasmática de células animais a esfingomiélin (ceramida 1 – fosfocolina; SM) é o esfingolípido mais comum, sendo a amina uma esfingosina (a preto na Figura 8 B) e o grupo X uma fosfocolina [29,32,33].

Os esteróis constituem a maior classe de lípidos não polares nas membranas celulares. A estrutura destes lípidos é caracterizada pela presença de um núcleo hidrofóbico esteroide composto por quatro anéis (três anéis com seis carbonos e um com cinco - ciclopentanoperidrofenantreno) ligados a um grupo OH hidrófilo. O núcleo esteroide é compacto e rígido uma vez que não permite a rotação em torno da ligação C-C [18,29,33]. Em mamíferos o esterol predominante é o colesterol (Figura 10) que contém um esqueleto hidrocarbonado não polar (núcleo esteroide e cadeia acilo lateral em C-17) e um grupo polar OH, já referido, em C-3 [29,32]. O colesterol encontra-se em teores elevados (cerca de 10 a 30%) nas membranas plasmáticas e tem um papel muito importante nas células como por exemplo na organização e fluidez dos lípidos membranares e ainda na atividade de algumas proteínas [35–37].



**Figura 10:** Estrutura do colesterol com representação a azul da numeração dos carbonos 3 e 17 onde se ligam o grupo OH e a cadeia acilo, respetivamente (adaptado de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com) – acedido a 8 de Agosto às 18h).

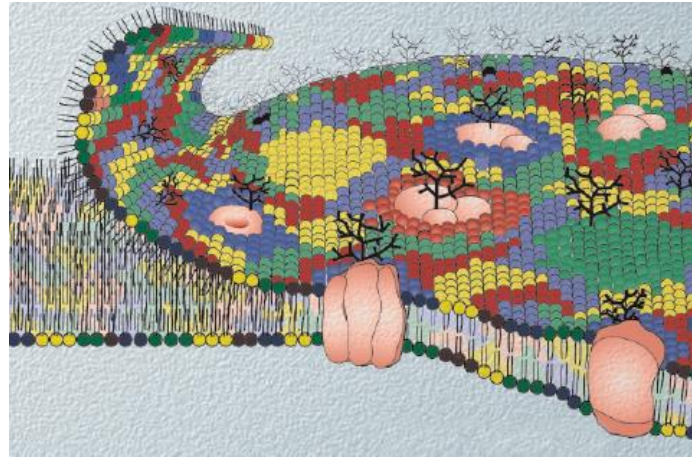
Na classe dos glicolípidos estão incluídos os glicoglicerolípidos ou glicosfingolípidos. Os primeiros são bastantes comuns em plantas e bactérias, mas são extraordinariamente raros em animais. Os glicolípidos do segundo grupo contêm uma ligação osídica ao grupo hidroxilo terminal da ceramida. Os grupos glicídicos podem variar de um monóxido até polímeros mais complexos. Os cerebósidos apresentam apenas uma ose ligada à ceramida, normalmente a glucose ou a galactose. Os glangliósidos são o grupo de glicosfingolípidos mais complexos que contêm um oligósido ligado à ceramida [29,32].

### **1.6 Organização e estrutura das membranas**

Até à sensivelmente 40 anos a membrana era considerada uma entidade marcadamente estática. No entanto em 1972 Singer e Nicolson propõem que a membrana é formada por uma bicamada lipídica fluída e que os componentes membranares têm liberdade de difusão lateral. A aparência global é a de uma biomembrana composta por proteínas (periféricas ou intrínsecas) embebidas numa bicamada de fosfolípidos aleatoriamente distribuídos – aspeto de um mosaico (modelo do mosaico fluído) [30,38].

Nos últimos anos, vários aspetos não previstos pelo modelo do mosaico fluído têm sido alvo de intensa investigação científica e têm-se acumulado evidências de que a distribuição dos lípidos nas membranas não é aleatória. Hoje sabe-se que diferentes tipos de membranas (por exemplo membrana do núcleo, do Golgi, dos lisossomas) têm composições lipídicas distintas, e que esta composição tem importantes consequências na organização dos lípidos na membrana [27,29]. Para além disso também se sabe que as biomembranas são assimétricas, está bem estabelecido que na membrana plasmática de células animais fosfatidiletanolaminas (PEs) e fosfatidilserinas (PSs) se localizam predominantemente na camada interna ou citosólica e que fosfatidilcolinas (PCs) e esfingomielina (SM) predominam na camada externa. Sabe-se também que o grau de insaturação dos ácidos gordos é maior na camada interna [27,39,40]. A composição lipídica distinta no exterior e interior da bicamada pode afetar vários aspetos da estrutura e função das membranas, incluindo a formação de domínios lipídicos. A formação de domínios pode levar a co-localização ou segregação de proteínas e compartimentalização da membrana em diferentes áreas com composições e propriedades distintas. Tem sido sugerido que estas regiões têm funções biológicas específicas como tráfego intracelular e transdução de sinal. Um dos domínios mais descritos na literaturas são as jangadas lipídicas, que são regiões especializadas da membrana, enriquecidas em esteróis e esfingolípidos, envolvidos na regulação de diversos processos celulares. [39–41]. Outro aspeto muito estudado é o papel biológico das estruturas não-lamelares (hexagonais e cúbicas) que se formam espontaneamente em certos

sistemas modelo de membrana. Estas estruturas podem estar envolvidas em certos processos biológicos específicos como exocitose, permeabilidade a iões e processos de fusão de membranas [40,42,43]. Atualmente é aceite um modelo membranar com base nos aspetos anteriormente referidos, a Figura 11 mostra um exemplo de uma membrana segundo um modelo do mosaico fluido modificado.



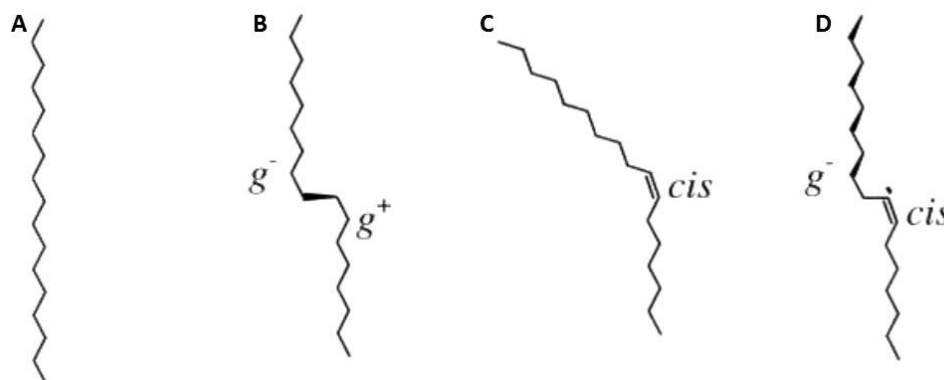
**Figura 11:** Diagrama esquemático do modelo do mosaico fluido modificado - incluindo interações específicas lípido-proteína, assimetria e organização da membrana. As cores representam diferentes lípidos [30].

## 1.7 Caraterização de fases lipídicas

A maioria dos lípidos forma espontaneamente bicamadas em meios aquosos com pH e força iónica semelhantes aos fisiológicos. No entanto esta não é a única estrutura possível, dependendo do pH, da quantidade de água presente no sistema, da temperatura, pressão e força iónica diferentes estruturas podem ser obtidas. As estruturas dividem-se em dois tipos: Lamelar, em que os lípidos estão dispostos numa bicamada e não-lamelar em que os lípidos estão em fase hexagonal ou cúbica [27,29]. Uma vez que as biomembranas têm uma estrutura essencialmente lamelar e que os estudos realizados para esta tese foram feitos em bicamadas lipídicas, aqui apenas serão discutidas as fases lamelares. No entanto há que lembrar que as fases não-lamelares podem ocorrer nas membranas biológicas e têm um papel importante em processos biológicos específicos, como já referido [42,43].

Nas fases lipídicas lamelares, as cadeias acilo encontram-se no interior da bicamada e os grupos polares estão direccionados para o exterior. A principal diferença entre as diversas fases está na conformação das cadeias acilo dos lípidos (*trans* ou *gauche*). Na conformação *trans* (*t*) os átomos de carbono adjacentes aos átomos de uma dada ligação têm orientações opostas (Figura 12 A), opostamente ao que acontece na conformação *gauche* (*g<sup>+</sup>* e *g<sup>-</sup>*) (Figura 12 B). Estas conformações dependem principalmente do tipo de lípido, do comprimento da cadeia acilo e

da posição e configuração das insaturações na cadeia acilo. Por exemplo, uma ligação dupla *cis* (a mais frequente nas cadeias acilos dos lípidos membranares) introduz uma alteração conformacional do mesmo tipo que a conformação *gauche* (Figura 12 C e D) [29,42].



**Figura 12:** Representação das conformações: **A** – *Trans*; **B** – *Gauche* ( $g^+ tg^-$ ); **C** – Duplas *cis* isolada; **D** – *cis* –  $tg^-$  (adaptado de [29]).

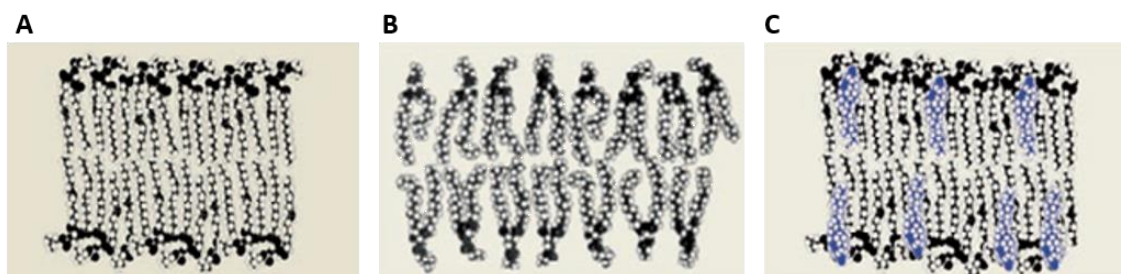
A fase cristalina ( $L_C$ ) é formada a baixa hidratação e/ou temperatura e, tal como na fase gel ( $L_\beta$  - Figura 13 A) as cadeias acilo estão maioritariamente na conformação *trans*. A fase gel difere da cristalina na maior hidratação e na menor densidade de empacotamento. Na fase gel as cadeias acilo dos lípidos estão ordenadas (completamente distendidas), a espessura da membrana é máxima e a difusão de solutos no plano da membrana é baixa ( $10^{-16} - 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) [28,36,44].

A fase fluida ou líquida cristalina ( $L_\alpha$  - Figura 13 B) é a estrutura mais observada nas membranas biológicas (de acordo com o modelo de Singer e Nicolson) e caracteriza-se pelo aparecimento de “defeitos” nas cadeias acilo dos lípidos devido à presença de conformações *gauche*. Neste tipo de estrutura a espessura da membrana é menor (as conformações *gauche* são responsáveis pelo encurtamento das cadeias acilo), o grau de hidratação aumenta bem como a velocidade de difusão de solutos no plano da bicamada ( $10^{-8} - 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) e as cadeias acilo dos lípidos estão mais desordenadas. Esta fase é, também, usualmente chamada de líquido-desordenado ( $L_d$ ). Sabe-se que bicamadas que contenham mais lípidos saturados com cadeias acilo de tamanhos idênticos formam membranas mais ordenadas (fase gel) do que membranas contendo lípidos com cadeias acilo insaturadas [36,44].

Os esteróis, nomeadamente o colesterol, por si só não formam bicamadas lipídicas mas juntamente com outros lípidos podem formar estruturas com uma fase líquido-ordenado ( $L_o$  - Figura 13 C). Nesta fase os lípidos estão mais ordenados, como na fase gel, mas permanece a elevada mobilidade de solutos como na fase líquida [18,45].

A uma dada temperatura, uma bicamada constituída por um único fosfolípido pode coexistir na fase fluida e gel, sendo essa temperatura conhecida como temperatura de transição de fase principal –  $T_m$ . Todos os lípidos têm uma  $T_m$  específica e a essa temperatura ocorre a transição entre a fase gel (estável abaixo da  $T_m$ ) e a fase fluida (estável acima da  $T_m$ ). Esta temperatura depende do comprimento e do grau de insaturação da cadeia acilo dos lípidos, aumentando com o comprimento da cadeia acilo e diminuindo com a presença de insaturações. Se as insaturações se situarem próximas do início ou fim da cadeia a diminuição é pequena, mas se a insaturação ocorrer no centro da cadeia a diminuição é bastante notável. Para lípidos com diferentes cabeças polares e caudas idênticas, o grau de hidratação da cabeça polar afeta a  $T_m$ , sendo esta menor para cabeças polares mais hidratadas. O pH pode, também, afetar a  $T_m$  uma vez que as cabeças polares têm comportamentos ácido-base que se refletem no seu grau de hidratação. [29,44,46].

A mistura de lípidos (binária ou ternária) resulta num comportamento de fases mais complexo, podendo existir duas ou três fases em simultâneo. Por exemplo numa mistura contendo colesterol e dois lípidos um com uma  $T_m$  elevada e outro com uma  $T_m$  baixa [36,44]. Os diagramas de fase permitem prever qual ou quais as fases que ocorrem dependendo da fração molar e da temperatura do sistema.



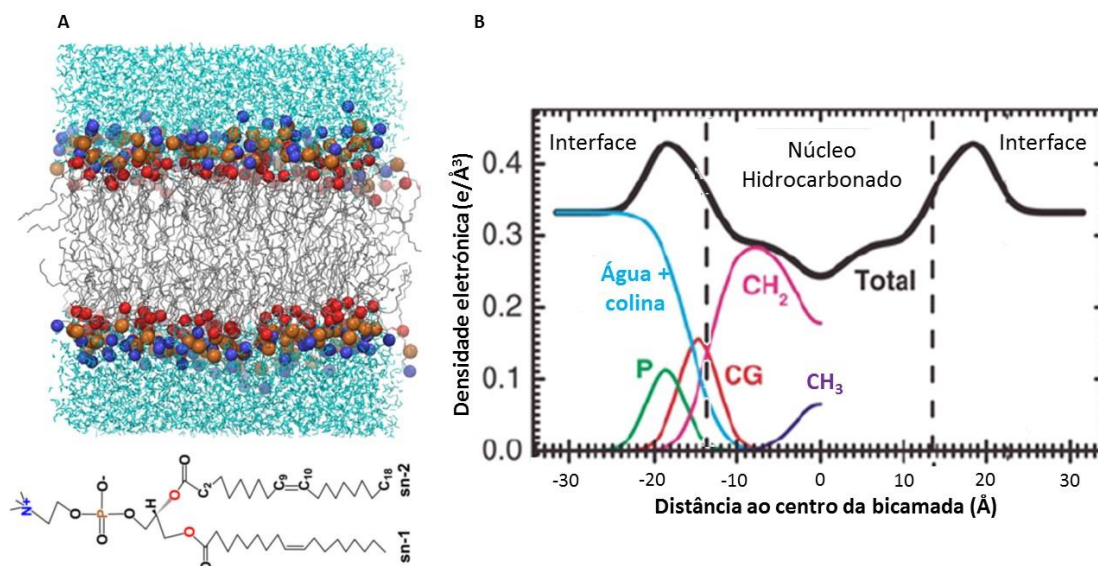
**Figura 13:** Representação de fases lamelares comuns: **A** - Fase gel ( $L_\beta$ ); **B** – Fase fluida ou líquido-desordenado ( $L_\alpha$  ou  $L_d$ ); **C** – Fase líquido – ordenado ( $L_o$ ), a azul estão representadas moléculas de colesterol.

### 1.7.1 DOPC e DPPC

Neste trabalho foram usadas vesículas unilamelares grandes<sup>3</sup> (secção 1.8) de DOPC e DPPC como modelo membranar. O DOPC tem uma dupla ligação *cis* em cada cadeia acilo no carbono 9 o que introduz uma alteração conformacional do tipo *gauche*, formando deste modo uma fase líquido-desordenado ( $L_d$ ) à temperatura ambiente ( $T_m = -22\text{ °C}$ ), como a representada na Figura 13 B. O DPPC não tem cadeias com duplas ligações e forma uma fase gel à temperatura ambiente

<sup>3</sup> Nesta tese foram usadas vesículas unilamelares grandes (LUVs) como modelo membranar, sendo que por vezes podem aparecer referidas como vesículas apenas, lipossomas ou bicamadas.

( $T_m \approx 42\text{ }^\circ\text{C}$ ) [29]. A fase gel formada pelo DPPC é pouco diferente da representada na Figura 13 A. Como a cabeça polar (PC) é larga ( $\approx 0,50\text{ nm}^2$ ), este lípido forma uma fase gel inclinada ( $L_\beta$ ), onde as cadeias orientam-se com uma certa inclinação (cerca de  $30^\circ$ ) de modo a garantir um empacotamento ótimo. Apesar de o DOPC também ter uma cabeça polar PC, a inclinação referida não é necessária, porque na fase fluida há um aumento da área no plano da bicamada ocupada por cada cadeia acilo devido à ligação dupla *cis* [29].



**Figura 14:** Estrutura de uma bicamada de DOPC em fase fluida: **A** - Obtida por simulação de dinâmica molecular com 128 moléculas de DOPC e 5763 moléculas de água. As cores representadas na imagem da bicamada correspondem aos átomos com a mesma cor na imagem da estrutura do DOPC, em baixo, e a azul mais claro estão representadas as moléculas de água (adaptada de [47]); **B** - Obtida por difração de raios - X com a bicamada totalmente hidratada. As contribuições individuais para a densidade eletrônica total (a preto) são mostradas nas linhas coloridas: Azul - água - colina; verde - fosfato; vermelho - glicerol - carbonilo; roxo - metilo; cor de rosa - metileno (adaptado de [48])

Para bicamadas de DOPC, o modelo mais usado neste trabalho, a área por lípido a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  é cerca de  $71,8 \pm 2,5\text{ Å}^2$  [49] e a espessura da membrana  $4\text{ nm}$  [50], uma representação de uma bicamada de DOPC em fase fluida obtida por simulação molecular e por resultados de difração de raios-x são mostradas na Figura 14 A e B respetivamente [47,48]. Nas imagens está bem demonstrado a desordem térmica da bicamada, na imagem B isso é demonstrado pela largura das bandas de densidade eletrônica. Em ambas as imagens também é visível a heterogeneidade da interface, característica que enriquece a possibilidade para associações não covalentes com proteínas de membrana, por exemplo, e no caso mais concreto deste trabalho com os complexos estudados.

## 1.8 Sistemas modelo de biomembranas e sondas de membrana

A complexidade e o papel fundamental das membranas biológicas têm motivado o desenvolvimento de uma ampla variedade de sistemas modelo mais simples, que retendo a estrutura essencial da bicamada lipídica, simplificam o sistema de modo a que os papéis dos componentes individuais possam ser avaliados [29,51].

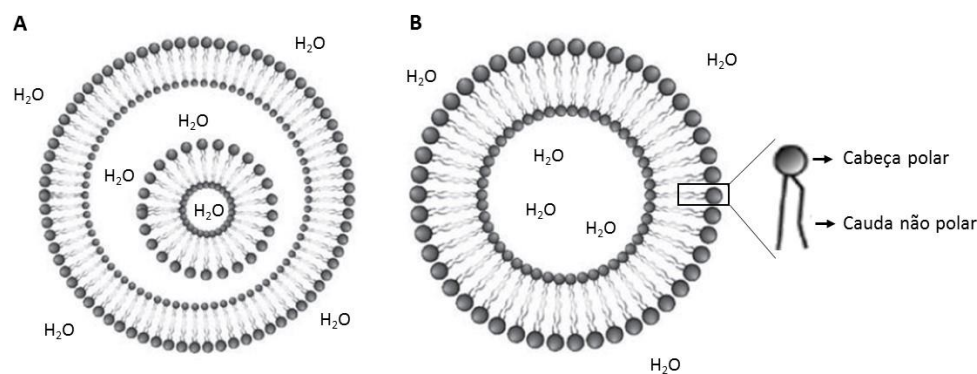
Dos diversos sistemas modelo de biomembranas, os lipossomas são as estruturas mais populares e que se mostram ser mais adequados no estudo da interação fármaco-membrana. Outra abordagem no uso de lipossomas é o transporte de fármacos até ao local de ação (*drug delivers*), resultando no aumento da atividade terapêutica do fármaco [52,53].

Os lipossomas podem ser preparados com apenas um lípido, com misturas de lípidos, e incluir ou não proteínas [29]. Atualmente já existem protocolos de preparação de lipossomas com diferentes constituições na camada externa e interna [39,54]. Para além de uma grande possibilidade de composições, estes sistemas modelo têm a vantagem de serem mais facilmente manuseados e mais reprodutíveis do que a utilização de células ou tecidos animais.

Está bem estabelecido que a dispersão de fosfolípidos num meio aquoso forma espontaneamente vesículas multilamelares (MLVs) – Figura 15 A - com tamanho na ordem dos micrómetros. Estes lipossomas (ou vesículas) são de fácil preparação, uma vez que lípidos com caudas hidrófobas se organizam espontaneamente em água com formação de MLVs a concentrações bastante baixas (aproximadamente  $10^{-11}$  M) [29,55]. A partir das MLVs é possível preparar lipossomas com uma única camada (unilamelares) e com tamanhos controlados que representam uma melhor aproximação às membranas biológicas. As vesículas unilamelares são classificadas de acordo com o seu tamanho: vesículas unilamelares pequenas (SUVs) com um diâmetro entre 25 - 50 nm, as vesículas unilamelares grandes (LUVs) com diâmetros entre 50 – 500 nm, e as gigantes (GUVs) com diâmetros até 300  $\mu$ m [29,51,56].

As LUVs – Figura 15 B - foram o modelo membranar usado neste trabalho. As LUVs são preferidas às SUVs porque estas são muito menos estáveis, podendo originar partículas de maiores dimensões devido a fusão e têm uma elevada curvatura que provoca dificuldades de empacotamento dos fosfolípidos [29]. Há vários métodos para formar LUVs a partir de MLVs. Neste trabalho usou-se a extrusão, método descrito detalhadamente na secção 4.7.





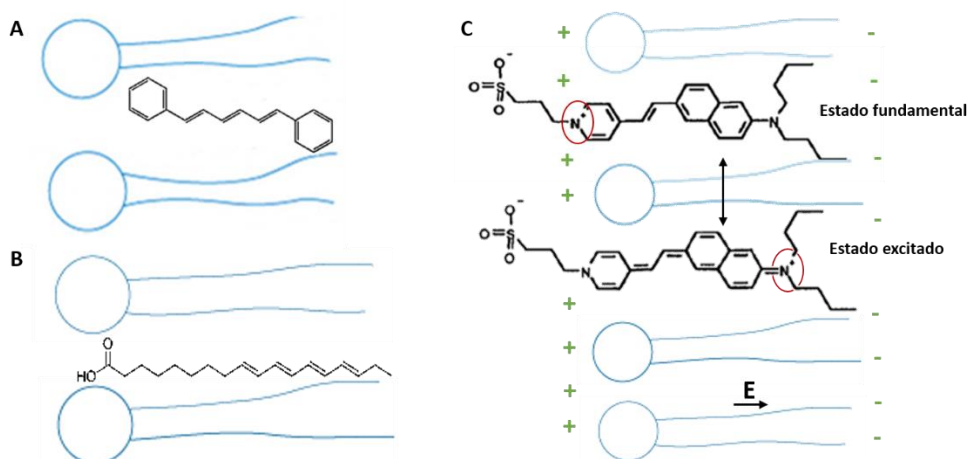
**Figura 15:** Representação esquemática da estrutura de modelos membranares: **A** – MLVs; **B** – LUVs.

Com o aumento de evidências sobre a grande importância dos lipídios de membrana em vários processos biológicos, foram aumentando o número de técnicas úteis para estudar mais detalhadamente a estrutura e função das membranas. A espectroscopia de fluorescência é uma poderosa ferramenta para o fazer. Como os lipídios não são fluorescentes, o uso de sondas de membrana é essencial. Estas são sondas extrínsecas e podem ser análogas dos lipídios naturais ou moléculas lipofílicas sem analogia com lipídios naturais. Para o sucesso da aplicação destas sondas é importante conhecermos o seu coeficiente de partição membrana/água ( $K_p$ ), que está relacionado com a incorporação da sonda na membrana. Assim, um  $K_p$  elevado indica uma maior preferência pela membrana (definição matemática de  $K_p$  na 4.14 - Equação 17) [57,58].

Neste trabalho foram usadas três diferentes sondas de membrana: DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno), di-4-ANEPPS (4,4-Aminonafetiletetilpiridínio) e *t*-PnA (ácido trans-parinárico). Estas sondas têm diferentes localizações na membrana e são sensíveis a diferentes propriedades, permitindo assim a obtenção de informação complementar sobre o sistema.

A fluorescência do DPH (Figura 16 A – preto) em água é praticamente desprezável, mas quando se incorpora na membrana há um grande aumento da sua fluorescência, ficando localizada no interior da bicamada com uma orientação paralela às cadeias acilo dos ácidos gordos (Figura 16 A), localização que resulta da sua natureza hidrofóbica [59]. O DPH é visto como uma sonda de membrana por excelência ( $K_p = 1,3 \times 10^6$  em DPPC) e não tem uma preferência por domínios gel ou fluidos [57,58]. Os elevados valores de anisotropia observados para o DPH na ausência de um movimento rotacional (despolarização) e a sua grande sensibilidade à reorientação do eixo longo da sonda fazem com que seja bastante utilizado em estudos de fluidez da membrana e com que seja bastante sensível à reorientação angular das cadeias acilo dos lipídios [60]. Por exemplo o colesterol induz efeitos na anisotropia do DPH, no entanto não altera a sua posição na membrana, mas apenas o seu movimento [59].

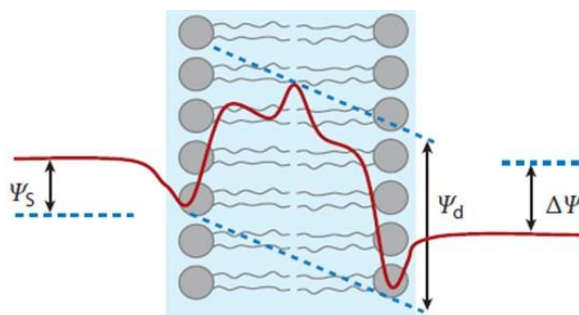




**Figura 16:** Representação da estruturas das sondas, a preto, e da sua localização na membrana, a azul: **A** – Representação da estrutura do DPH e da sua localização na membrana; **B** – Representação da estrutura do *t*-PnA e da respetiva localização na membrana; **C** – Representação da estrutura do Di-4-ANEPPS no estado fundamental e excitado, destacando-se a localização da carga com um círculo a vermelho. Representação, também, da distribuição de cargas no exterior e interior da membrana, a verde, e a direção do campo elétrico no interior da membrana (E). Por uma questão de simplificação apenas é apresentada uma camada de lípidos ao invés da bicamada característica (adaptado de [61] e de [www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Lipids-and-Membranes/Other-Nonpolar-and-Amphiphilic-Probes.html](http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Lipids-and-Membranes/Other-Nonpolar-and-Amphiphilic-Probes.html) - acedido a 3 de Setembro de 2013).

O *t*-PnA (Figura 16 B - preto) é uma sonda de membrana com uma estrutura semelhante aos lípidos, em que o seu fluoróforo se encontra “enterrado” na bicamada lipídica (Figura 16 B). É uma sonda bastante sensível ao micro-ambiente e, ao contrário do DPH, apresenta uma partição preferencial por domínios gel: o seu  $K_p$  numa fase gel é  $5 \times 10^6$  e numa fase fluida é de  $1,7 \times 10^6$  [62,63]. O seu tempo de vida médio é altamente dependente do empacotamento das cadeias acilo, apresentando uma componente longa no tempo de vida médio superior a 30 ns na presença de domínios ordenados. Esta característica tem sido explorada com êxito para revelar a presença de domínios lipídicos e heterogeneidade tanto em lipossomas como em membranas biológicas [57,64].

O Di-4-ANEPPS (Figura 16 C – preto) faz parte de um diverso conjunto de sondas principalmente sensíveis ao potencial de dipolo da membrana [65,66]. Na membrana podem ser detetados três tipos de potencial eletrostático, como representado na Figura 17: i) potencial transmembranar ( $\Delta\psi$ ) que se define como a diferença de potencial entre o meio aquoso de um lado e outro da membrana, ii) potencial de superfície ( $\psi_s$ ) que é a diferença entre o potencial à superfície da membrana e o meio aquoso e iii) potencial de dipolo ( $\psi_D$ ) que é a diferença de potencial entre o centro da bicamada lipídica e a interface membrana/água.



**Figura 17:** Perfil do potencial eletrostático através de uma bicamada lipídica. O Potencial transmembranar ( $\Delta\Psi$ ) surge devido ao gradiente seletivo de iões através da membrana. O potencial de superfície ( $\Psi_s$ ) surge devido às cargas fixas da interface membrana/água, em membranas biológicas surge principalmente devido a lípidos carregados negativamente (na imagem assume-se que a densidade de cargas é idêntica nas duas superfícies). O potencial de dipolo ( $\Psi_d$ ) tem origem na orientação dos grupos dipolares dos lípidos com as moléculas de água (adaptado de [65]).

Este tipo de sondas usualmente tem um par de cadeias hidrocarbonadas que atuam como âncoras de membrana (ficam situadas no interior da membrana) e um grupo hidrófilo responsável por posicionar o fluoróforo perpendicularmente à interface membrana/água. Após excitação há uma redistribuição da carga do fluoróforo, como ilustrado na Figura 16 C, sendo este o mecanismo responsável pela sensibilidade destas sondas ao potencial de dipolo da membrana. A orientação que o Di-4-ANEPPS tem na membrana assegura que a redistribuição de carga que ocorre na excitação ocorra paralelamente ao campo elétrico dentro da membrana (Figura 16 C). Deste modo uma mudança na voltagem que atravessa a membrana causará um desvio espectral resultante da interação direta entre o campo elétrico e os momentos dipolares dos estados fundamental e excitado da sonda [65,67]. Sabe-se ainda que esta sonda tem um  $K_p$  mais elevado numa fase  $L_o$  do que  $L_d$  e maior nestas duas do que numa fase gel [68]

Esta sonda é bastante usada para detetar a presença de colesterol ou domínios enriquecidos em colesterol, como as jangadas lipídicas [68]. É, também, uma sonda muito sensível à penetração de água na bicamada e a ligações de hidrogénio [61,68].

## 2 OBJETIVOS

Os lípidos de membrana desempenham um papel fundamental em vários processos celulares. Para além disso sabe-se que cada tipo de célula tem uma composição lipídica específica e as células tumorais não são exceção: vários são os estudos que indicam que há alterações ao nível dos lípidos em células tumorais. Isto faz da membrana plasmática um excelente alvo terapêutico quer por permitir aumentar a seletividade dos fármacos para células cancerígenas, quer por poder fornecer um novo mecanismo de ação baseado na reposição dos níveis normais de lípidos e/ou sua reorganização na membrana.

Paralelamente a este conhecimento, tem sido crescente o desenvolvimento de novos fármacos anticancerígenos de ruténio com um elevado poder citotóxico e alguns deles eficazes contra tumores resistentes ao tratamento com cisplatina. Um estudo de fracionamento celular, efetuado pelo Laboratório de Química Organometálica, mostrou que compostos de Ruténio sintetizados nesse grupo e, semelhantes aos estudados nesta tese ficavam em grande percentagem na membrana plasmática.

A questão principal a que se pretende responder com esta tese é se a membrana celular poderá ser um alvo terapêutico para a ação destes compostos (todos os compostos usados no trabalho estão apresentados no esquema 1). Esta abordagem é completamente inovadora e a interação deste tipo de compostos com membranas encontra-se praticamente por estudar.

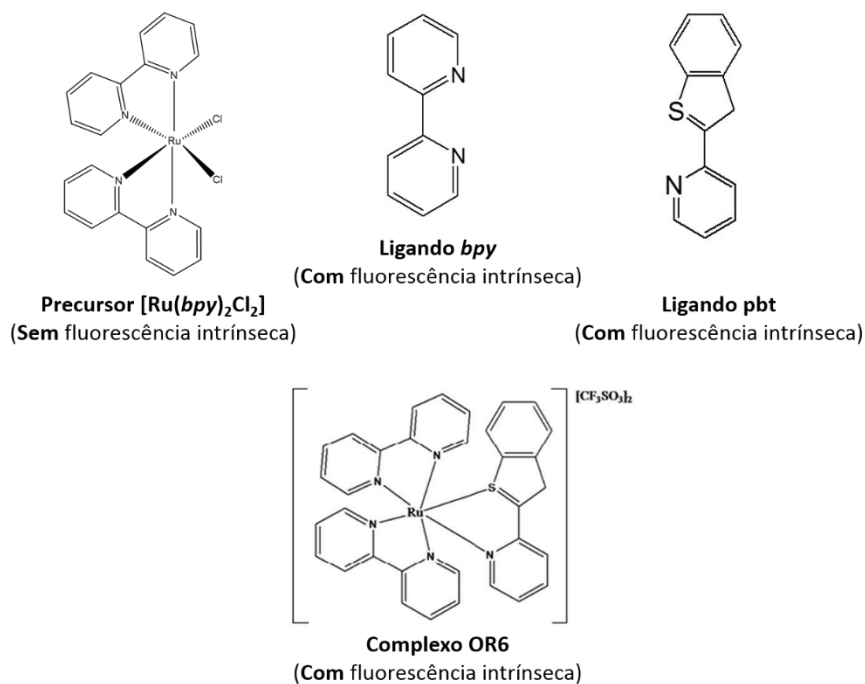
Para responder à questão principal foi seguida uma abordagem em que se avaliou: i) se os complexos citotóxicos de Ruténio estudados interatuam com modelos membranares (bicamadas lipídicas – lipossomas); ii) de que forma as propriedades das bicamadas lipídicas são alteradas por ação dos compostos; iii) a interação dos compostos é ou não influenciada pelos ligandos; iv) se a presença dos compostos altera a integridade da bicamada; v) a internalização na membrana de forma quantitativa – cálculo dos valores de  $K_p$  dos complexos e dos seus ligandos; vi) se existe alguma correlação entre a citotoxicidade destes compostos e as propriedades observadas neste trabalho.

Uma primeira etapa do trabalho consistiu em avaliar propriedades dos compostos (complexos, ligandos e precursores) em solução, como solubilidade, estabilidade e fluorescência, com o objetivo de definir condições experimentais ótimas para os estudos seguintes, na presença de bicamadas. Uma vez que, como referido a cima, a interação destes compostos com membranas é praticamente desconhecida, para cumprir os objetivos foi necessário recorrer a um modelo membrana mais simples. Assim o modelo usado foi LUVs, sobretudo de DOPC, mas também de DPPC e de DMPC:DMPG (7:3 mol:mol). Nos estudos

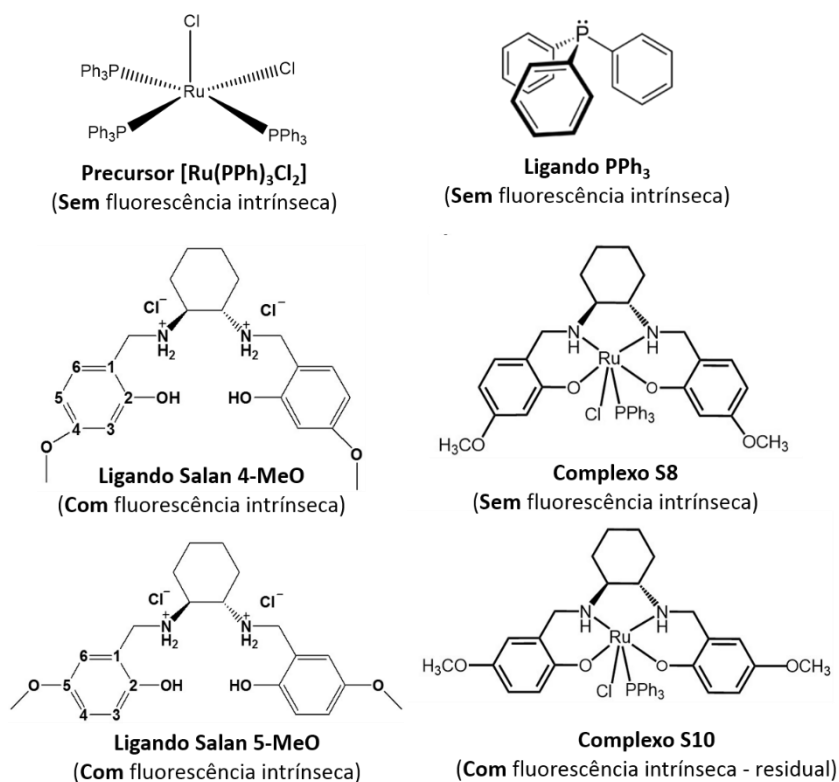
envolvendo LUVs os objetivos foram: i) estudar o efeito que a presença das bicamadas tinha nos compostos, nomeadamente ao nível das suas propriedades fluorescentes (que refletem o seu microambiente) e da sua estabilidade; ii) estudar o efeito dos compostos em certas propriedades membranares, como potencial de dipolo, hidratação, permeabilidade e estabilidade do modelo membranar. A determinação do  $K_p$  dos compostos também foi uma etapa crucial, na medida em que permitiu quantificar a extensão da interação dos compostos com a membrana e melhorar a interpretação dos restantes resultados.

Os capítulos 3 e 4 incidem sobre as técnicas utilizadas e pormenores específicos inerentes a este trabalho. Usou-se uma combinação de diferentes técnicas, em concreto espectroscopia (UV-Visível e fluorescência, com especial enfoque nesta última), *Dynamic Light Scattering* e potenciais zeta. Os resultados obtidos e discussões são apresentados nos capítulos 5 e 6 e finalmente as conclusões e perspetivas futuras são incluídas no capítulo 7.

## Compostos da Série I



## Compostos da Série II



**Esquema 1:** Representação das estruturas de todos os compostos usados neste trabalho. Compostos da Série I:  $[Ru(bpy)_2Cl_2]$ , Ligandos *bpy* e *pbt* e complexo OR6. Compostos da Série II:  $[Ru(PPh_3)_3Cl_2]$ , ligandos Salan 4-MeO, Salan 5-MeO e  $PPh_3$  e complexos S8 e S10.

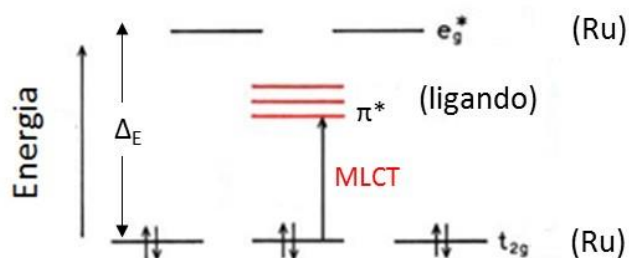
## OBJETIVOS

### 3 TÉCNICAS UTILIZADAS

#### 3.1 Espectroscopia de absorção UV-Visível

A espectroscopia de absorção UV-Visível teve neste trabalho um papel fundamental, uma vez que serviu para caracterizar e avaliar a estabilidade dos compostos em solução. Através da caracterização dos compostos em solução conseguimos definir condições para os estudos de fluorescência, como comprimentos de onda de excitação. O estudo da estabilidade dos compostos foi crucial na medida que conseguimos definir condições, como tempos de incubação dos compostos antes de adição às membranas, de modo a otimizar o desenho experimental.

Os compostos estudados nesta tese, são complexos de Ruténio de geometria octaédrica, como já foi referido. Segundo a teoria do campo cristalino a presença dos ligandos origina uma divisão das orbitais  $d$  do metal, inicialmente degeneradas, em dois níveis de energia ( $e_g$  e  $t_{2g}$ ). A energia das orbitais do átomo central (átomo de metal) que estiverem dirigidas para os ligandos aumenta (menor estabilidade) e a energia das que se encontrarem entre os ligandos diminui (maior estabilidade). As orbitais  $t_{2g}$  são as de energia mais baixa e dizem respeito às orbitais  $d_{xy}$ ,  $d_{yz}$  e  $d_{xz}$  do átomo de metal. As orbitais  $e_g$  são as de energia mais elevada correspondendo às orbitais  $d_{x^2-y^2}$  e  $d_{z^2}$ . A diferença de energia,  $\Delta_E$ , que separa estas orbitais mede a interação metal-ligando e depende do metal e do ligando envolvidos na esfera de coordenação do complexo: quanto maior for a intensidade da interação metal-ligando, maior será o valor de  $\Delta_E$  [69,70].



**Figura 18:** Representação da disposição das orbitais em complexos metálicos de estrutura octaédrica.  $\Delta_E$  – diferença de energia entre as orbitais  $t_{2g}$  e  $e_g$ ; MLCT – Transferência de carga entre o metal e o ligando (adaptado de [69]).

Na Figura 18 está, representado um caso em que as três orbitais  $d$  de mais baixa energia estão completas com seis eletrões, são um exemplo desta situação complexos de Ru(II) de baixo *spin*, como o complexo OR6. Quando o ligando possui um conjunto de orbitais vazias de baixa energia há possibilidade de haver uma nova transição que envolve a transferência de carga entre o metal e o ligando, designada por MLCT (*Metal to Ligand Charge Transfer*), para além da possibilidade de ocorrerem transições  $d-d$  entre as orbitais do metal e transições entre as

orbitais dos ligandos. As transições de carga entre o metal e o ligando dão origem a bandas de absorção tipicamente na zona do visível, enquanto transições na zona do UV têm a sua origem em transições entre as orbitais do ligando (normalmente  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) [16,70].

Explicada a existência de bandas na região do UV-visível destes compostos, associada à simplicidade, velocidade, precisão e baixo custo da técnica de espectroscopia UV-Visível, é fácil compreender a razão da sua utilização em estudos iniciais de otimização.

### 3.2 Espectroscopia de fluorescência

A luminescência é a emissão de luz ultravioleta, visível ou infravermelha de uma espécie química a partir de um estado excitado. Dependendo da forma como ocorre a excitação, a classificação da luminescência é diferente. Designa-se fotoluminescência ao processo onde se insere a fluorescência (emissão a partir de estados excitados singuleto) e a fosforescência (emissão a partir de estados excitados tripleto). Nestes casos a emissão luminescente é despoletada pela absorção de luz (fotões) [69,71].

Após a absorção de um fotão para níveis eletrónicos e vibracionais excitados dá-se a relaxação rápida ( $\approx 10^{-12}$  s) para o nível vibracional mais baixo do primeiro estado eletrónico singuleto excitado ( $S_1$ ). O regresso ao estado fundamental singuleto ( $S_0$ ) pode ser acompanhado por emissão luminescente ou por outras formas de decaimento não radiativas (conversão interna, cruzamento intersistemas, transferência de carga intermolecular, entre outros). O rendimento quântico de fluorescência define-se pela razão entre o número de fotões emitidos pelo processo de fluorescência e o número total de fotões absorvidos, e depende precisamente dos processos de emissão radiativos ( $k_r$ ) e dos não radiativos ( $k_{nr}$ ). Uma das formas de obter o valor do rendimento quântico de fluorescência ( $\phi_F$ ) é através da Equação 1:

*Equação 1*

$$\phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

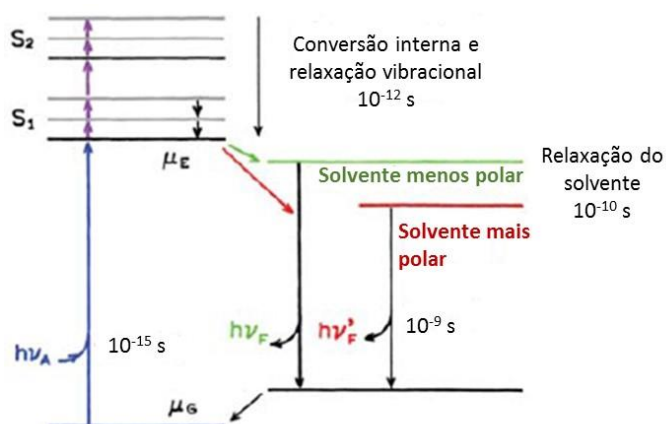
A espectroscopia de fluorescência é uma técnica com elevada sensibilidade intrínseca e capacidade de obtenção de informação dinâmica devido à escala de tempo de emissão de fluorescência em conjunto com a resolução de deteção. Por exemplo o ambiente em que se encontra o fluoróforo provoca alterações quer em medidas de estado estacionário quer em medidas de estado transiente, o que pode acontecer por exemplo por aumento da “rigidez” membranar. Estas propriedades fazem da técnica uma ótima ferramenta para estudar as propriedades biofísicas da membrana tanto em sistemas modelo como biológicos [29,57]. De seguida serão abordadas as medidas de fluorescência de que se fez uso nesta tese:



### 3.2.1 Espectros de excitação e emissão

Um espectro de excitação tem uma forma idêntica ao espectro de absorção, desde que haja uma única espécie no estado fundamental. Se estiverem presentes várias espécies, ou quando uma espécie única existe em diferentes formas no estado fundamental (por exemplo agregados ou complexos) os espectros de excitação e absorção já não são sobreponíveis. Um espectro de emissão reflete a distribuição de probabilidade das várias transições do nível energético mais baixo do nível  $S_1$  para os vários níveis vibracionais de  $S_0$ . O espectro de emissão é característico de um dado composto. Na prática um espectro de emissão corresponde a variações na intensidade de fluorescência ( $I_F$ ) em função do comprimento de onda de emissão,  $\lambda_{em}$ , para um comprimento de onda de excitação fixo  $\lambda_{ex}$  (selecionado por um monocromador), enquanto um espectro de excitação reflete variações na  $I_F$  em função do comprimento de onda de excitação,  $\lambda_{ex}$ , para um comprimento de onda de emissão fixo [69,71].

Os espectros de fluorescência, tal como os de absorção, são sensíveis a alterações no meio. A polaridade do solvente, por exemplo, tem um grande efeito nas propriedades espectrais dos fluoróforos: Na secção 3.2 foi referido que há um processo de relaxação vibracional até ao nível vibracional mais baixo do  $S_1$ , a partir de onde ocorre, depois, a emissão. Este processo faz com que a emissão de fluorescência ocorra a comprimentos de onda menos energéticos relativamente à absorção. Ou seja, entre o espectro de absorção e o de emissão existe um desvio, denominado de desvio de *Stokes*. O efeito da polaridade do solvente desloca a emissão para níveis de energia ainda mais baixos devido à estabilização do estado excitado por solventes polares. Tipicamente, o fluoróforo tem um momento dipolar maior no estado excitado ( $\mu_E$ ) do que no estado fundamental ( $\mu_G$ ). Após a excitação os dipolos do solvente podem reorientar-se ou relaxar em torno  $\mu_E$  o que reduz a energia do estado excitado. À medida que a polaridade do solvente aumenta, este efeito torna-se maior, o que resulta em emissões com energias mais baixas ou comprimentos de onda maiores (desvios para o vermelho) [69]. A Figura 19 demonstra o efeito da polaridade do solvente na energia das transições. A ocorrência destes desvios pode ser bastante útil em espectroscopia de fluorescência para prever a polaridade do local onde está o fluoróforo.



**Figura 19:** Diagrama de Jablonski para fluorescência com efeito da relaxação do solvente em ambientes com polaridades diferentes. O processo de conversão interna refere-se ao decaimento da molécula do estado energético S<sub>2</sub> para o estado energético S<sub>1</sub>. Relaxação vibracional é o processo pelo qual uma molécula passa de um nível vibracional do estado excitado S<sub>1</sub> para o nível vibracional mais baixo desse nível eletrônico. Relaxação do solvente corresponde à reorientação da esfera de solvatação em torno do fluoróforo enquanto este se encontra no estado excitado, e que leva a uma estabilização energética adicional deste (adaptado de [69]).

### 3.2.2 Anisotropia de fluorescência

Após a excitação de uma solução homogênea com luz polarizada, os fluoróforos que têm o seu momento de transição de absorção orientado na mesma direção que o vetor campo elétrico da luz incidente, serão preferencialmente excitados. Depois da excitação de uma amostra com luz polarizada a emissão é também polarizada, sendo a extensão da polarização da emissão descrita em termos de anisotropia,  $\langle r \rangle$ . Isto é, medidas de anisotropia revelam o deslocamento angular médio do fluoróforo que ocorre entre a absorção e a subsequente emissão de um fóton. Este deslocamento angular depende da extensão da difusão rotacional durante o tempo de vida do estado excitado. Por sua vez, a taxa de difusão rotacional depende da viscosidade do solvente e do tamanho e forma da molécula em rotação. Por exemplo, para fluoróforos pequenos em soluções de baixa viscosidade a taxa de difusão rotacional é normalmente mais rápida que a taxa de emissão. Nestas condições a emissão é despolarizada e a anisotropia medida é perto de zero. Já amostras que têm anisotropia diferente de zero têm emissão polarizada [69,71].

Na prática a anisotropia mede-se recorrendo-se à seguinte equação,

*Equação 2*

$$\langle r \rangle = \frac{I_{VV} - G \times I_{VH}}{I_{VV} + 2 \times G \times I_{VH}}$$

em que, a letra V indica polarização vertical e a letra H horizontal, a primeira letra em índice refere-se sempre à polarização da excitação, e a segunda à de emissão. Por exemplo  $I_{VH}$  corresponde à intensidade resultante da excitação polarizada verticalmente e emissão polarizada horizontalmente. A letra G corresponde a um fator de correção que anula o efeito da

diferente sensibilidade do detetor à radiação com polarização vertical e horizontal e é calculado através da razão  $\frac{I_{HV}}{I_{HH}}$  [69,71].

### 3.2.3 Decaimentos de intensidade de fluorescência

Um decaimento de intensidade de fluorescência é obtido após um pulso de excitação infinitamente curto, com energia suficiente para que um determinado número de moléculas passem para o estado excitado. Pelo facto das constante de velocidade para os processos radiativos e não radiativos apresentadas no início desta secção (Equação 1) serem de 1ª ordem, a intensidade de fluorescente ( $i(t)$ ) que se observa em cada instante após um pulso de excitação de largura infinitesimal no instante zero é dada por:

*Equação 3*

$$i(t) = k_r[M^*]_0 \exp\left(\frac{-t}{\tau_0}\right)$$

onde  $k_r$  é a constante de velocidade de processos radiativos;  $[M^*]_0$  é o número de moléculas excitadas por unidade de volume,  $t$  é o tempo decorrido e  $\tau_0$  é o tempo de vida do estado excitado e é dado por  $\tau_0 = 1/(k_r + k_{nr})$ . A Intensidade decresce ao longo do tempo de acordo com uma lei exponencial. Os decaimentos de fluorescência podem ser descritos por apenas uma exponencial (decaimentos simples) ou por uma soma de exponenciais (decaimentos complexo). A Equação 4 descreve um decaimento multi-exponencial (complexo) com  $n$  componentes [71]:

*Equação 4*

$$i(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right)$$

onde  $\alpha_i$  é a pré-exponencial normalizada ou amplitude, que está relacionada com  $f_i$  (contribuição de cada espécie cromófora para a intensidade de fluorescência total), e  $\tau_i$  o tempo de vida da espécie  $i$ . De acordo com esta equação, após um pulso de excitação a intensidade de fluorescência sofre uma diminuição exponencial em função do tempo [71].

Quando um decaimento de fluorescência de um fluoróforo é multi-exponencial, a forma natural de definir o tempo de vida médio é [71]:

*Equação 5*

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i} = \sum_{i=1}^n f_i \tau_i$$

Nesta definição, cada tempo de vida é ponderado pelas correspondentes intensidades fracionárias. Esta média é chamada de tempo de vida ponderado pelas intensidades ou tempo

de vida médio de fluorescência. Este corresponde ao tempo de vida do estado excitado que é definido como o tempo médio que a molécula passa no estado excitado antes de regressar ao estado fundamental [69,71].

Outra possibilidade é usar as amplitudes (fatores pré-exponenciais) como peso

*Equação 6*

$$\bar{\tau} = \sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i$$

em que  $\alpha_i = \frac{\alpha_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i}$ , com  $\sum_{i=1}^n \alpha_i = 1$ .

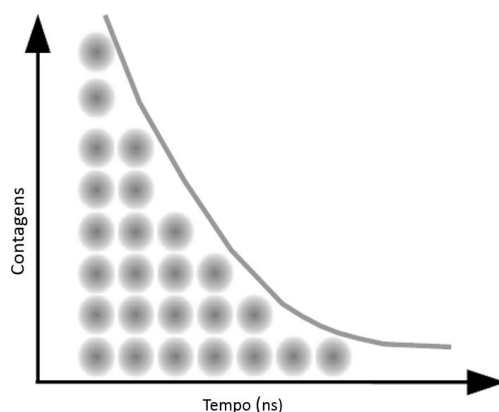
O tempo de vida médio pesado pelas amplitudes é proporcional ao rendimento quântico e por isso é, também, designado por tempo de vida ponderado pelo rendimento quântico [71].

Existem dois métodos para a determinação de tempos de vida de um fluoróforo, fluorometria de pulso que analisa os dados recolhidos no domínio tempo e fluorometria de fase que faz a análise dos dados no domínio das frequências [69,71]. De seguida, irá ser abordado o primeiro método, uma vez que foi o utilizado para obtenção dos decaimentos de intensidade de fluorescência.

A fluorometria de pulso é a técnica mais popular para determinação de tempos de vida (ou parâmetros do decaimento). O método TCSPC (*time-correlated single-photon counting*), mais conhecido como SPT (*single-photon timing*) é a base para obtenção dos tempos de vida. O princípio básico assenta no facto de que a probabilidade de detetar um único fotão no tempo  $t$ , após um impulso de excitação, é proporcional à intensidade de fluorescência nesse momento. O registo de um único fotão envolve a cronometragem entre o pulso de excitação e a emissão do fotão, os dados são guardados na forma de um histograma [69,71].

Na prática, a experiência começa com um pulso de excitação, realizado por um nanoLED, que emite pulsos de luz com duração idealmente infinitesimal e periódicos, sendo enviado um sinal que passa através de um discriminador de função constante (CFD – *constant function discriminator*). O pulso elétrico correspondente será encaminhado para um conversor de tempo-amplitude (TAC – *time-to-amplitude converter*) que gera uma rampa de voltagem, cuja voltagem aumenta proporcionalmente com o tempo. Um segundo canal deteta o pulso da chegada do fotão. O tempo de chegada do fotão é precisamente determinado usando o CFD, que envia um sinal para parar a rampa de voltagem. O TAC contém agora uma voltagem proporcional à diferença de tempo entre o pulso de excitação e a deteção do fotão ( $\Delta t$ ). A voltagem é convertida num valor numérico através de um conversor analógico-digital (ADC – *analog-to-digital converter*). Finalmente ocorre a conversão da informação numérica por um

analisador multicanais (MCA) que pela soma dos vários pulsos constrói um histograma de contagens em função do tempo (Figura 20) [69,71].



**Figura 20:** Histograma de contagens de fótons ao longo do tempo para obtenção do tempo médio de vida de uma espécie fluorescente (adaptado de [http://www.picoquant.com/technotes/technote\\_tcspc.pdf](http://www.picoquant.com/technotes/technote_tcspc.pdf) - acessado a 3 de Julho de 2013).

### 3.3 Determinação do diâmetro médio de LUVs

As determinações da distribuição de tamanhos das suspensões de lipossomas unilamelares foram realizadas por dispersão dinâmica de luz ou *Dynamic Light Scattering* (DLS). O princípio de DLS tem em conta que as partículas finas e moléculas que estão em movimento aleatório térmico constante, chamado movimento *Browniano*, se difundem a uma velocidade relacionada com o seu tamanho, uma vez que as partículas menores têm uma difusão mais rápida do que as partículas maiores. A velocidade do movimento *Browniano* depende também da temperatura, por isso o controlo da temperatura é essencial para uma medição precisa do tamanho [72]. A técnica mede a intensidade das flutuações na dispersão de luz na escala de tempo da difusão molecular (microsegundos), sendo que as flutuações ocorrem devido ao movimento *Browniano* [73]. A medição da intensidade de luz dispersa (as mudanças de intensidade são tanto mais rápidas quanto menores forem as vesículas em suspensão) em função do tempo,  $I(t)$ , permite a determinação do tamanho das partículas. Isto é conseguido através de uma função de auto correlação de segunda ordem que correlaciona os pontos da função  $I(t)$  (Equação 7), onde  $I_t$  e  $I_{t+\Delta t}$  são um ponto da função  $I(t)$  e outro ponto seguinte (distanciado por  $\Delta t$ ) da mesma função [73]:

Equação 7

$$g_2(t) = \langle I_t \times I_{t+\Delta t} \rangle$$

A função de auto correlação de segunda ordem pode ser relacionada com a de primeira ordem através da

Equação 8:

Equação 8

$$g_2(t) = \langle I_t^2 \rangle - \beta g_1^2(t) + \langle I_t \rangle^2$$

$\beta$  é uma constante instrumental que reflete um desvio à correlação ideal (idealmente  $\beta=1$ ) e  $g_1(t)$  é definido pela Equação 9:

Equação 9

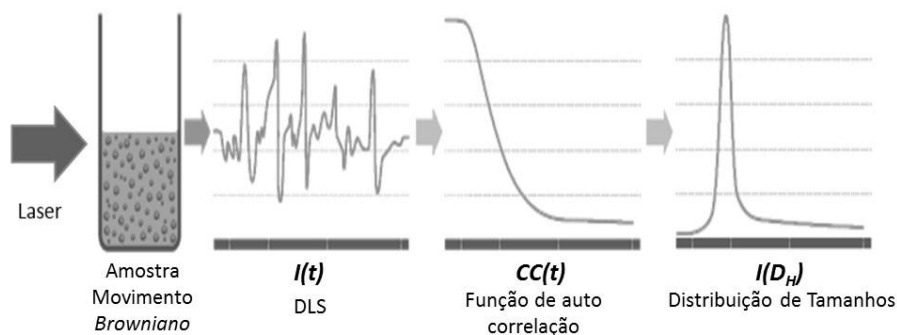
$$g_1(t) = e^{-\Gamma t}, \text{ onde } \Gamma = Dq^2$$

Através desta equação o coeficiente de difusão ( $D$ ) das partículas pode ser obtido através da taxa de decaimento ( $\Gamma$ ) e do vetor de dispersão ( $q$ ) da função de intensidade.

Tendo o coeficiente de difusão das partículas ( $D$ ) o diâmetro hidrodinâmico ( $D_H$ ) pode ser obtido através da distribuição de *Stokes-Einstein* (Equação 10) onde  $D$  é o coeficiente de difusão,  $T$  é a temperatura,  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $k_B$  é a constante de Boltzmann. Como resultado obtém-se um gráfico de distribuição da dispersão de intensidades em função de  $D_H$  ( $I(D_H)$ ) [72–74]. A Figura 21 exemplifica o procedimento descrito.

Equação 10

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_H}$$



**Figura 21:** Representação esquemática do procedimento usado para a obtenção dos tamanhos de LUVs. Depois de se fazer incidir uma radiação laser na amostra há a construção de um gráfico de flutuações na intensidade da dispersão de luz detetadas na escala dos microsegundo (DLS). Segue-se a obtenção de uma curva de auto correlação e, desta, uma distribuição da dispersão de intensidades em função do tamanho da partícula, adaptado de <http://www.malvern.com/common/downloads/MRK1839.pdf> - acedido a 17 de Junho de 2013).

### 3.4 Determinação do potencial zeta de LUVs

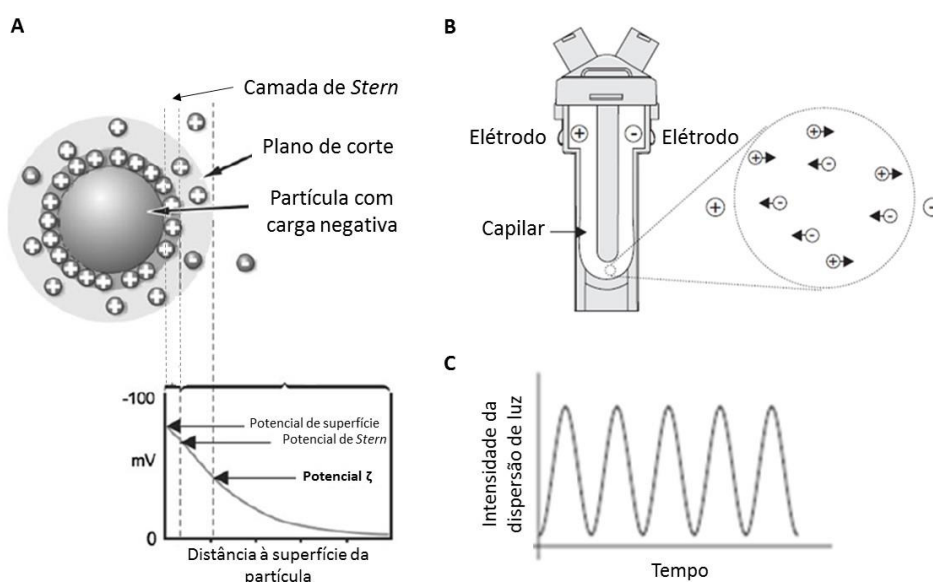
O potencial zeta ( $\zeta$ ) está relacionado com a carga superficial das partículas: a carga superficial de uma partícula em suspensão atrai contra iões presentes no meio, formando uma camada de *Stern*. Depois desta, outra camada é formada onde há maior mobilidade dos contra iões (plano de corte). O potencial zeta, expresso em mV, é definido como a diferença de

potencial existente entre o meio de dispersão e o plano de corte e que representa uma esfera imaginária na qual o solvente se desloca acompanhando o movimento da partícula (Figura 22 A) [75,76].

A técnica consiste em medir a velocidade das partículas enquanto elas se movem devido a uma microeletroforese. A amostra é colocada numa célula que contem um pequeno capilar com um elétrodo em cada extremidade onde é aplicado um campo elétrico que implica a deslocação das partículas da amostra em direção ao elétrodo com carga oposta (Figura 22 B). A velocidade a que as partículas se movem é proporcional à intensidade do campo aplicado e ao seu potencial zeta. A velocidade do movimento de cada partícula (mobilidade eletroforética) por ser determinada por *Laser Doppler Anemometry* em que a velocidade de cada partícula é relacionada com a frequência, medida pela flutuação na intensidade de luz dispersa (Figura 22 C). A mobilidade eletroforética é traduzida em potencial zeta aplicando a Equação 11, onde  $\epsilon$  é a constante dielétrica do meio,  $U_E$  a mobilidade eletroforética,  $\eta$  a viscosidade do meio e  $f(Ka)$  a função de *Henry*. O valor desta função é considerado 1,5 quando as partículas estão suspensas numa solução aquosa com elevada força iónica (aproximação de Smoluchowski) e 1 quando o meio de suspensão é não aquoso (aproximação de Huckel) [75–77].

Equação 11

$$U_E = \frac{2\epsilon\zeta f(ka)}{3\eta}$$



**Figura 22:** **A** – Potenciais presentes numa partícula em suspensão; **B** – Célula com um elétrodo em cada extremidade e deslocação das partículas em direção ao elétrodo com carga oposta após aplicação de um campo elétrico; **C** - Gráfico de flutuações na intensidade da dispersão de luz detetada ao longo do tempo (adaptado de <http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20chapter%2016.pdf> - acedido a 19 de Junho de 2013).





## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 Reagentes

Solventes orgânicos como etanol (EtOH), metanol (MeOH) e clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) espectroscópicos, necessários para a preparação das soluções de sondas de membrana e soluções de lípidos, assim como o dimetilsulfóxido espectroscópico (DMSO) usado como co-solvente para dissolver em solução aquosa tamponada alguns dos compostos usados, foram adquiridos à VWR Internacional (Radnor, PA, EUA).

No trabalho experimental foram usadas soluções tampão com duas composições distintas: Hepes 10 mM pH 7,4 e Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM, daqui por adiante designados por tampão 1 e 2, respetivamente. As soluções tampão foram preparadas em água bi-destilada e desionizada por um sistema Mili-Q A10 da Milipore (Billerica, MA, USA) com resistividade de 18.2 M $\Omega$  cm. O pH daquelas soluções foi ajustado recorrendo-se a soluções de ácido ou base concentradas (HCl 2 M e NaOH 4 M, respetivamente) usando-se um medidor de pH Crison microPH 2001 (Barcelona, Espanha). À Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA) adquiriu-se o Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperizenoetanosulfónico), o ácido clorídrico (HCl) e o hidróxido de sódio (NaOH). O cloreto de sódio (NaCl) foi adquirido à Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os ligandos pbt (2-(2-piridil)benzo[b]tiofeno) e *bpy* (2,2'-bipiridina) foram adquiridos à TCI Europe N.V. (Eschborn, Germany), e o ligando  $\text{PPh}_3$  (trifenilfosfano) e o precursor  $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}_2]$  à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). Os dois ligandos Salan 4-MeO-Sal-Chan (Salan 4-MeO) e 5-MeO-Sal-Chan (Salan 5-MeO) foram sintetizados a partir de ciclohexamodiamina e 4-metoxi-salicialdeído ou 5-metoxi-salicialdeído da Sigma-Aldrich. Os complexos S8 e S10 foram obtidos por reação do precursor  $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}_2]$  com cada um dos ligandos Salan indicados [16]. Sendo a sua estrutura química confirmada por várias técnicas ( $^1\text{H}$  NMR, EPR, FT-IR, UV-Vis e Dicroísmo Circular) [16]. O complexo OR6 foi sintetizado por reação com o precursor  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$  com o ligando pbt.

Os fosfolípidos foram adquiridos à Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EUA) e à Lipoid (Newark, NJ, EUA), não havendo influência da origem da compra nos resultados experimentais: 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-Dimiristoil-*sn*-3-fosfoglicerol (DMPG) e 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-fosfocolina (DMPC). As soluções *stock* dos diferentes lípidos foram feitas em  $\text{CHCl}_3$  e guardadas a -18 °C protegidas da luz, para evitar a sua degradação. Todos os lípidos usados tinham grau de pureza superior a 99%.

Os reagentes usados no doseamento lipídico, como o hidrogenofosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e molibdato de amónio  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}]$  foram comprados à Merck (Darmstadt,

Alemanha), à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA) foi adquirido o ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) e o ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) à Farma-Química Sur S.L. (Málaga, Espanha).

As sondas de membrana utilizadas, DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno) e di-4-ANEPPS (4,4-Aminonafetiletetilpiridínio) foram adquiridas à Molecular Probes/Invitrogen (Eugene, OR, EUA) e o *t*-PnA (ácido *trans*-parinárico) à Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). As duas primeiras sondas foram preservadas em MeOH e a última em EtOH.

Outros produtos utilizados ao longo do trabalho experimental como o detergente Triton X-100, gel Sephadex G-75 e a sonda carboxifluoresceína foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA) e a rodamina B à Merck (Darmstadt, Alemanha).

Para os reagentes cujo grau de pureza não é indicado foi utilizado o grau de pureza mais elevado disponível.

## 4.2 Material

As leituras de absorvência e espectros de absorção foram realizadas nos espectrofotômetros Jasco V-560 e V-660 (Easton, MD, EUA).

Para preparar LUVs foram usadas membranas de policarbonato (Nuclepore, Track-Etch Membrane) da Whatman Scheider & Schuell (Kent, Reino Unido) e um Mini-extrusor da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EUA)

A maioria dos estudos de espectroscopia de fluorescência em estado estacionário foram realizados no espectrofluorímetro Spex Fluorolog — 3 v2.2 da HORIBA Jobin Yvon (Kyoto, Japão), mas algumas leituras foram realizados no leitor de microplacas spectraMEX GeminiEM da Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EUA), este é um equipamento com fendas fixas de 5 nm. As medidas em estado transiente foram realizadas no Fluorohub v2.0 também da HORIBA Jobin Yvon acoplado ao espectrofluorímetro usado nas medidas em estado estacionário. Os nanoLED necessários para estas medidas são, também, da HORIBA Jobin Yvon.

Os aparelhos utilizados para medir o tamanho e potencial zeta das LUVs foram, respetivamente, o ZetaSizer nano S e ZetaSizer nano Z ambos da Malvern Instruments (Worcestershire, Reino Unido).

Outros materiais comuns de laboratório foram necessários ao longo de todo o trabalho experimental como um vortex VV3 da VWR Internacional (Radnor, PA, EUA), banho polystat 33(86633) da Grant instruments (Cambridge, Reino Unido), termobloco SB42000D/3 da Stuart Scientific (Staffordshire, Reino Unido), células de quartzo tanto 1 cm X 1 cm como 1 cm X 0,4 cm da Helma Analytics (Müllheim, Alemanha) e microseringas da Halminton (Höchst, Germany) ou da VWR Internacional.

### 4.3 Medidas de fluorescência

Neste trabalho foram realizados dois tipos de medidas de fluorescência, medidas em estado estacionário e medidas resolvidas no tempo, usando células de quartzo de 1 cm X 0,4 cm com a orientação do maior percurso ótico na excitação. Isto é, a excitação foi realizada ao longo da face de 1 cm e a emissão recolhida segundo a face dos 0,4 cm. Este procedimento permite aumentar a intensidade do sinal recolhido.

O procedimento realizado foi para todas as amostra igual, à exceção dos comprimentos de onda usados e das fendas de excitação e emissão (passarão a ser designadas apenas por fendas, uma vez que tiveram sempre a mesma largura). Estes parâmetros para os compostos e sondas fluorescentes foram em todas as experiências os mesmos e estão referidos nas Tabelas 2 e 3.

Cada estudo efetuado continha os respetivos brancos<sup>4</sup>, que foram descontados a cada amostra. A contribuição do branco é expressa em percentagem e corresponde a fenómenos inerentes à própria amostra, como são casos de dispersão elástica de luz e dispersão de Raman. As percentagens de branco obtidas ao longo deste trabalho foram inferiores a 20%, exceto quando se trata de compostos pouco fluorescentes, como o caso do complexo S10, ou do ligando *bpy* e do complexo OR6 na presença de bicamadas lipídicas, em que se obtiveram percentagens de branco mais elevadas (cerca de 60%).

#### 4.3.1 Medidas de fluorescência em estado estacionário

As medidas de fluorescência em estado estacionário foram de três tipos: Espectros de excitação/emissão, intensidade de fluorescência (a comprimentos de onda fixos) e anisotropia. Estas foram realizadas no espectrofluorímetro Spex Fluorolog— 3 v2.2, com monocromadores duplos na excitação e na emissão e em geometria de ângulo reto. A fonte de luz é uma lâmpada de xénon de 450 W que emite fótons a um fluxo constante, isto é, uma quantidade constante de fótons por unidade de tempo. Sob uma fonte de luz constante, a concentração de fluoróforos excitados mantem-se constante, e daí que nestas condições as medidas se designem por medidas em estado estacionário. Foi usado como referência um fotodíodo.

Uma vez que a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração da amostra apenas para baixas absorvências [71] as amostras utilizadas para estudos de fluorescência não tinham absorvência superior a 0,1 nos comprimentos de onda de interesse. As concentrações dos compostos foram ajustadas de forma a que este requisito fosse cumprido.

---

<sup>4</sup> Em cada protocolo serão referidas as constituições dos brancos. No entanto, de um modo geral, o branco refere-se a uma amostra em que não há adição do composto ou da sonda.

#### 4.3.1.1 Espectros de excitação e emissão

Para obtenção de espectros de excitação e emissão não foram usados polarizadores e foram efetuados com um tempo de integração de 0,2 s, com fendas ajustadas à intensidade de sinal da amostra de forma a não saturar o detetor. As fendas usadas para as sondas e compostos fluorescentes estão referidas na Tabela 2 e os respetivos comprimentos de onda de excitação e emissão na Tabela 3.

**Tabela 2:** Fendas para os compostos fluorescentes e sondas em estado estacionário e transiente para a obtenção de espectros, medidas de anisotropia e decaimentos de intensidade de fluorescência.

Fendas (nm)				
	Nome	Espectros	Anisotropia	Decaimentos de intensidade de fluorescência
Sonda	DPH	2	5	5
	<i>t</i> -PnA	2	5	5
	Di-4-ANEPPS	2	5	15
Composto	OR6	4	10	15
	pbt	2	5	6
	<i>bpy</i>	4	15	15
	Salan 4-MeO	4	10	15
	Salan 5-MeO	4	10	15

Os espectros de excitação podem ser distorcidos por variações na intensidade da luz de excitação, sendo estas variações devidas à dependência do comprimento de onda com a intensidade da lâmpada, e pela eficiência de transmissão do monocromador de excitação. Já os espectros de emissão são distorcidos pela dependência do comprimento de onda com a eficiência do monocromador de emissão e pela resposta do detetor (tubo fotomultiplicador). Posto isto, a correção dos espectros obtidos é importante, principalmente em casos de medidas quantitativas [71]. As variações na intensidade da luz de excitação foram efectuadas através da divisão pelo sinal da referência, enquanto que as restantes distorções foram corrigidas através da aplicação de ficheiros de correção disponibilizados pelo fabricante.

#### 4.3.1.2 Intensidade de fluorescência

As determinações da intensidade de fluorescência a um comprimento de onda fixo foram realizadas sem polarizadores e repetidas 10 vezes para cada amostra. A cada valor de intensidade de fluorescência foi subtraído o valor da média da intensidade de fluorescência do respetivo branco. As medidas foram usadas na determinação dos coeficientes de partição membrana/água ( $K_p$ ) dos compostos.

#### 4.3.1.3 Anisotropia de fluorescência

As medições de anisotropia foram feitas usando o espectrofluorímetro já mencionado, recorrendo-se ao uso de polarizadores Glan-Thomson, estando as fendas, mais uma vez referenciadas na Tabela 2. Os valores de anisotropia apresentados correspondem à medida de pelo menos três replicados e foram calculados através da Equação 2. Em cada replicado foram realizadas sete medidas, e a cada uma delas descontada a média das sete medidas obtidas para o branco.

#### 4.3.2 Medidas de fluorescência em estado transiente

Nas medidas em estado transiente usou-se o Fluorohub v2.0 acoplado ao espectrofluorímetro usado para as medidas em estado estacionário que permite obter decaimentos temporais de fluorescência pela técnica de cronometragem de um fóton único. Neste caso a excitação foi feita por um nanoLED pulsado e a detecção com um tubo fotomultiplicador TBX-04 com resolução de 50 ps.

O comprimento de onda dos nanoLEDs foi o mais próximo possível do comprimento de onda de excitação da amostra em causa e a emissão recolhida ao comprimento de onda de emissão máximo. Estas condições estão representadas na Tabela 3 e as fendas são mencionadas Tabela 2 (neste caso apenas foi necessário controlar as fendas de emissão, uma vez que a radiação emitida pelo nanoLED é essencialmente monocromática). Apenas referir que quando se utilizou a sonda DPH a emissão foi recolhida a 450 nm. Este comprimento de onda não corresponde ao máximo de emissão do DPH, mas utilizou-se este uma vez que com a excitação a 370 nm (nanoLED 370 nm) a dispersão de Raman, devida à vibração de estiramento simétrico do O-H da água, ocorre a um comprimento de onda muito próximo do máximo de emissão da sonda DPH (430 nm).

A escala de tempo usada, para a obtenção de todos os decaimentos obtidos neste trabalho, foi de 55517 ps/canal. O número de contagens no canal máximo foi de 10000 ou 20000 (as contagens mais baixas foram utilizadas para amostras em que o tempo de aquisição era superior a 20 min, devido à sua baixa intensidade de fluorescência). Para a seleção dos comprimentos de onda de emissão foi usado o mesmo monocromador que nas medidas em estado estacionário.

Os parâmetros de ajuste dos decaimentos foram obtidos usando o programa Time-Resolved fluorescence Anisotropy (TRFA) Data Processor v.1.4 (Minsk, Belarus) e a sua qualidade avaliada através do valor do  $\chi^2$  reduzido, e dos gráficos de resíduos relativos e de auto-correlação dos resíduos. Em todas as análises, os valores de  $\chi^2$  reduzido não foram superiores a 1,4 e a

distribuição dos resíduos e auto-correlação foi aleatória em torno de zero. Foi preciso a soma de duas a quatro exponenciais para descrever os decaimentos de intensidade de fluorescência.

Para os decaimentos das sondas de membrana utilizou-se uma dispersão de *scattering* – Ludox® (sílica coloidal) para a desconvolução do pulso de excitação e, foram analisados em simultâneo a amostra, o branco e o dispersante. Relativamente aos decaimentos dos compostos fluorescentes teve de se recorrer a um padrão de tempos de vida de fluorescência (Rodamina B em metanol [71]), uma vez que o tempo de vida de fluorescência era bastante curto e não se conseguiu fazer uma análise fidedigna com uso do dispersante para a desconvolução. No método de análise dos decaimentos com uso de um padrão (método da referência), é necessário analisar previamente o decaimento do padrão (Rodamina-B) e determinar o seu tempo de vida, que foi próximo do valor indicado na literatura para as mesmas condições experimentais. O valor da literatura é de 2,53 ns [71] e nas diversas análises que se realizaram obtivemos valores entre 2,52 e 2,54 ns. Posto isto, para analisar os decaimentos dos compostos analisou-se em simultâneo a amostra, o branco e o padrão (cujo valor do tempo de vida foi necessário introduzir no programa de análise).

**Tabela 3:** Comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados em estado estacionário e transiente para as sondas de membrana e compostos em estudo.

		Estado Estacionário		Estado Transiente	
	Nome	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	$\lambda_{ex}$ (nm) (nanoLED)	$\lambda_{em}$ (nm)
Sonda	DPH	360	430	370 + filtro UGI (Jobin Yvon)	450
	<i>t</i> -PnA	470	635	315	635
	Di-4-ANEPPS	303	404	460	404
Composto	OR6	312 [15]	380 [15]	320	320
	pbt	310	372	320	372
	<i>bpy</i>	280	340	279	320
	S10	290	340		
	Salan 5-MeO	290	328	279	328
	Salan 4-MeO	277	304	279	304

#### 4.4 Estudos de solubilidade e estabilidade dos compostos

Os estudos de solubilidade foram realizados em DMSO, tampões 1 e 2. Para cada composto pesou-se aproximadamente 1 mg (sendo anotada a massa exata) e foi-se adicionando DMSO em alíquotas de 50 µL até à dissolução do composto (observação direta a olho nu). Procedeu-se de igual modo para os tampões, mas desta vez com alíquotas de 100 µL. Uma vez conseguida a solubilização do composto calculou-se a concentração máxima, sem ocorrência de precipitação, em cada solvente para cada composto (Tabela 5 na secção 5.1).

Os estudos de estabilidade foram realizados apenas para os compostos sintetizados no laboratório de química organometálica, por espectroscopia de Uv-Vis (250 nm – 900 nm), à temperatura ambiente durante 24 horas. Para o efeito utilizaram-se células de quartzo 1 cm X 0,4 cm. As condições experimentais para este estudo, tais como concentração e percentagem de DMSO a usar, foram obtidas anteriormente através dos estudos de solubilidade. Para cada composto realizou-se o estudo de estabilidade nas percentagens mínimas possíveis de DMSO e nos dois tampões. Para os complexos (S8, S10 e OR6) a estabilidade foi também estudada na presença de lípido DOPC. A diferença é que neste estudo as concentrações de complexo S8 e S10 foram mais baixas que em solução, uma vez que se teve de partir da solução *stock* em 2% DMSO para adição do composto às membranas. Teve também de se fazer um branco (sem composto) para se subtrair aos espectros, de modo a corrigir a dispersão de luz causada pelas LUVs.

Com os estudos de estabilidade foi não só possível confirmar a solubilidade dos compostos, uma vez que na ocorrência de precipitado há um aumento da turbidez da amostra e logo da absorvência residual ao longo do tempo (Figura A. 2). Como também avaliar a cinética de hidrólise dos mesmos através da percentagem de variação da absorvência correspondente ao máximo das bandas de transferência de carga (MLCT ou LMCT) e também da banda correspondente a transições ligando-ligando dos compostos durante um período de 24 horas, dada pela Equação 12:

*Equação 12*

$$\% \text{Variação} = \frac{(Abs_i - Abs_0)}{Abs_0} \times 100$$

onde  $Abs_i$  é a absorvência observada a tempo  $i$  e  $Abs_0$  é a absorvência no tempo inicial (zero).

## 4.5 Avaliação da fluorescência dos compostos

Antes de se prosseguir para os estudos de interação com bicamadas lipídicas, foi avaliada a fluorescência dos compostos. Para isso recorreu-se ao espectrofluorímetro já mencionado onde se fizeram espectros de emissão dos compostos a diferentes comprimentos de onda de excitação. Estes comprimentos de onda foram escolhidos tendo em conta os comprimentos de onda das bandas de absorvência máxima nos espectros UV-Vis dos compostos (espectros obtidos para os complexos e ligandos estão apresentados na secção 5.1 e para os precursores no anexo 9.3)

## 4.6 Doseamento de lípidos e sondas

Para a preparação dos diferentes modelos membranares foi necessário preparar soluções *stock* dos diferentes lípidos usados em clorofórmio espectroscópico. Para calcular o volume certo de solução de cada lípido a usar, foi imprescindível determinar a concentração das soluções *stock* preparadas. Para tal usou-se o Método de Rouser (1970) que se baseia na determinação colorimétrica de fosfato inorgânico no fosfolípido a dosear [78].

O doseamento de fosfato inorgânico por este método exigiu a preparação prévia de uma solução padrão de fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0,5 mM e de uma solução de molibdato de amónio a 1,25% (m/v). Estas soluções podem ser guardadas a 4 °C para utilizações posteriores. Foi, também, necessária uma solução de ácido ascórbico a 5% (m/v) que deve ser preparada de fresco em cada doseamento para não haver o risco de oxidação catalisada pela luz. Em cada doseamento fez-se uma curva de calibração, sendo para isso necessário colocar em tubos de vidro os volumes de solução padrão, em triplicado, necessários de modo a obterem-se as seguintes quantidades de fosfato inorgânico: 20; 30; 40; 50; 70 e 100 nmol. Foram ainda necessários dois tubos referentes ao branco (sem padrão). Tanto os padrões como o branco sofreram o mesmo tratamento a que foram sujeitas as amostras a dosear. Foi necessário efetuar-se uma diluição prévia das amostras (1:20), de modo a que as leituras se encontrassem dentro da curva padrão. Após a diluição das amostras foram colocados 30 µL de cada uma, em triplicado, em diferentes tubos. Todos os tubos (amostras, padrões e brancos) foram aquecidos a 180 °C até à secura total num termobloco. Depois disto, os tubos foram deixados a arrefecer até à temperatura ambiente sendo, seguidamente, adicionados 300 µL de ácido perclórico 70% (v/v) e colocados durante 45 minutos a 170 °C. É neste passo que ocorre a hidrólise ácida dos fosfolípidos e libertação do fosfato que irá ser doseado. De seguida removeram-se os tubos da unidade de aquecimento e deixaram-se a arrefecer. Depois do arrefecimento adicionou-se a cada tubo 1 mL de água MilliQ, 400 µL de molibdato de amónio a 1,25% (m/v), 400 µL de ácido ascórbico a 5% (m/v) e



homogeneizou-se a mistura usando um vortex. Finalmente colocaram-se os tubos num banho termostatzado a 100 °C durante 5 minutos. Nesta etapa o fosfato inorgânico na presença do molibdato de amónio é convertido a ácido fosfomolibdico que é reduzido pela adição de ácido ascórbico, formando um complexo azul após o aquecimento. Depois do arrefecimento dos tubos, o composto corado foi determinado por leitura de absorvência no visível, a 797 nm com células de quartzo 1 cm X 1 cm. Na Figura A. 1, em anexo, pode-se ver-se um exemplo de uma curva padrão obtida por este método.

A determinação da concentração das soluções *stock* das sondas de membrana usadas, DPH, Di-4-ANEPPS e *t*-PnA, foi feita espectrofotometricamente usando os seus coeficientes de absorção molar:  $\epsilon$  (DPH, 350 nm, MeOH) = 88000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (Di-4-ANEPPS, 497 nm, MeOH) = 42000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e  $\epsilon$  (*t*-PnA, 300 nm, EtOH) = 89000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> [68,79].

#### 4.7 Preparação de lipossomas

O modelo membranar usado neste trabalho foi lipossomas, mais especificamente LUVs (vesículas unilamelares grandes, do inglês *Large Unilamellar Vesicles*). A preparação de LUVs começou com a adição da quantidade(s) adequada(s) da(s) solução(ões) *stock* do(s) lípido(s) desejado(s) para um *ependorf*. Posteriormente, o solvente foi lentamente evaporado sob um fluxo contínuo e suave de azoto (N<sub>2</sub> (g)), de modo a formar-se uma fina camada de lípido na parte inferior do tubo ou *ependorf*. Seguidamente, recorrendo-se a uma bomba de vácuo, os lípidos foram deixados a secar durante, no mínimo, 4 h, de forma a assegurar a remoção total do solvente orgânico (clorofórmio). Depois da secagem em vácuo as amostras foram hidratadas com tampão 1 ou 2, dependendo do que se iria estudar (ver secções seguintes). O volume de tampão usado para a hidratação dos lípidos foi escolhido de modo a ficar-se com a concentração lipídica final desejada, sendo o tampão previamente aquecido acima da temperatura de transição (T<sub>m</sub>) do lípido ou mistura de lípidos em questão. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas num agitador vortex, seguindo-se a realização de oito ciclos de vortex/congelamento (N<sub>2</sub> (l))/descongelamento (T > T<sub>m</sub>). Estes ciclos são essenciais para diminuir o número de lamelas dos lipossomas, homogeneizar a composição e propriedades das várias bicamadas e eliminar fases metastáveis [55,80,81]. Por fim as amostras foram submetidas a extrusão a uma T > T<sub>m</sub>. O processo de extrusão consiste na passagem das amostras através de membranas de polycarbonato com diâmetro de poro bem definido, no presente caso de 100 nm, um número ímpar de vezes (21 vezes), usando um Mini-Extrusor. Este procedimento garante que a suspensão final passe pela membrana e que praticamente 100% dos lipossomas sejam

unilamelares e de tamanho idêntico [81,82], o que foi confirmado por DLS (*Dynamic Light Scattering* – anexo 9.5).

#### 4.8 Estudo do efeito do DMSO nas bicamadas lipídicas

Como a grande maioria dos compostos utilizados nesta tese necessitam de 2% (v/v) DMSO (daqui por diante sempre que for referida a percentagem de DMSO será relativa a (v/v), caso nada seja dito em contrário) para a sua solubilização em tampão, foi efetuado um estudo preliminar para avaliar as eventuais alterações que o DMSO pudesse provocar nas bicamadas lipídicas.

Nestas experiências foram utilizadas LUVs constituídas por DOPC e LUVs constituídas por DPPC, ambas na concentração final de 1 mM. Após a extrusão, as amostras foram divididas em diferentes microtubos *eppendorf*, adicionadas as sondas DPH, Di-4-ANEPPS e *t*-PnA através de microseringas (*gas-tight*), e deixadas a incubar durante 1h a  $T > T_m$ , de modo a facilitar a incorporação das sondas na bicamada lipídica. Foi também preparado um branco ao qual não se adicionou sonda. O volume de solução de cada sonda foi adicionado de forma a que a percentagem de MeOH ou EtOH não fosse superior a 1% (v/v) para garantir que o próprio solvente orgânico não provocasse alterações na estrutura da bicamada [83], e que a razão sonda/lípido fosse de 1:500. Posteriormente as amostras foram deixadas a arrefecer lentamente à temperatura ambiente, e seguidamente deixadas a 4 °C no escuro durante a noite, procedimento que facilita o equilíbrio de fases [79,84]. Este protocolo foi seguido sempre que se utilizaram sondas (pelo que nos procedimentos seguintes esta informação estará subentendida). No dia seguinte, adicionou-se DMSO a um conjunto de amostras de modo a que a sua percentagem fosse 5% (v/v) e a outro conjunto não se adicionou DMSO (controlo). Deixou-se o DMSO incubar durante 2 h com as LUVs e, depois procedeu-se às medidas de fluorescência aos comprimentos de onda de excitação e emissão máximos de cada sonda (condições experimentais na Tabela 2 e Tabela 3). Este estudo foi feito para os dois lípidos referidos (DOPC e DPPC) nos dois tampões, 1 e 2.

A partir do espectro de excitação do Di-4-ANEPPS, é possível calcular o valor de R, sendo este uma razão entre os valores de intensidade de fluorescência a 420 e 520 nm retirados do espectro de excitação, com emissão a 635 nm. Este parâmetro reporta alterações no potencial de dipolo da membrana. Ao longo dos resultados e discussão, mais detalhes sobre este parâmetro serão referidos (secções 5.2 e 5.4.1).

## 4.9 Preparação de soluções *stock* dos compostos para adição às LUVs

Para os estudos seguintes foi necessária a preparação prévia de soluções *stock* dos compostos em tampão para posteriormente se adicionarem às LUVs. Estas soluções foram preparadas tendo em conta o limite de solubilidade em tampão dos diferentes compostos, sendo preparadas na concentração máxima possível (Tabela 5). Na preparação destas soluções teve-se também em atenção que os complexos OR6, S8 e S10 precipitam no tampão 2, portanto foram sempre preparados em tampão 1 e sempre com pelo menos 2% de DMSO para os dois últimos. Os restantes compostos são solúveis em ambos os tampões e portanto, consoante a experiência, foram preparados num ou noutro tampão como será posteriormente referido, mas sempre com DMSO uma vez que nenhum deles é solúvel em tampão apenas. É importante referir que quando se disser em que tampão o lípido será hidratado, esse será também o tampão usado para a preparação das soluções *stock* dos compostos a estudar.

Todas as vezes que se fizeram estudos com os complexos S8 e S10, as soluções foram preparadas de modo a que antes da adição às LUVs tivessem decorrido, aproximadamente, 12 h de incubação<sup>5</sup>. Os restantes compostos não necessitaram de um tempo de incubação prévio antes da adição às LUVs, isto é, foram preparados e adicionados imediatamente (procedimento justificado na secção 5.1).

## 4.10 Efeito da bicamada lipídica nas propriedades fluorescentes dos compostos

Nesta etapa do trabalho foram usadas LUVs de DOPC na concentração final de 1 mM e estudados todos os compostos fluorescentes.

Para estudar a interação do complexo OR6 com as bicamadas de DOPC a hidratação do lípido foi feita com o tampão 1. Para os restantes compostos a hidratação foi feita com o tampão 2 (apesar de não precipitarem no tampão 1, escolheu-se o tampão 2 porque este contém NaCl que está presente no plasma humano, conferindo condições mais próximas das fisiológicas ao sistema). O volume de tampão foi adicionado de modo a que a concentração de lípido fosse 2 mM. Depois da extrusão foram colocados 500 µL de LUVs em diferentes *eppendorfs* e deixados a 4 °C no escuro, durante a noite. No dia seguinte foi adicionado, a cada *eppendorf*, 10 µL de

---

<sup>5</sup> O termo incubação irá aparecer ao longo desta tese com dois significados ligeiramente diferentes: Por um lado refere-se à incubação (tempo de espera) dos compostos em solução tamponada antes da sua adição às LUVs, e neste contexto pode, também, aparecer o termo “pré-incubação”. Por outro lado, pode também, aparecer referenciado como o tempo de incubação do composto com as bicamadas, já depois de uma incubação prévia em solução tamponada. Em ambos os casos irá ser sempre mencionado a que tipo de incubação se está a referir.

DMSO, ficando a suspensão de LUVs com 2% DMSO (este passo não foi efetuado no caso do estudo do complexo OR6 uma vez que este não necessita de DMSO). Foi, também, adicionado o volume necessário de composto para se obter a concentração desejada num volume final de 1 mL (as concentrações estão mencionadas na Tabela 4 e foram determinadas tendo em conta que a absorvência das amostras não deve ser superior a 0,1, conforme já explicado na secção 4.3.1). Finalmente, para perfazer o volume final de 1 mL, adicionou-se tampão contendo 2% DMSO (à exceção de quando se estudava o complexo OR6 em que se adicionou tampão sem DMSO). Depois da adição de todos estes componentes a concentração de lípido em cada amostra era de 1 mM.

**Tabela 4:** Tampão usado na preparação das soluções *stock* dos compostos fluorescentes, percentagem de DMSO e respetiva concentração nas LUVs.

Composto	Tampão <sup>a</sup>	% DMSO <sup>b</sup>	Concentração nas LUVs (μM)
OR6	1	0	10
pbt	2	2	10
bpy			10
Salan 4-MeO			20
Salan 5-MeO			15

**a** - Tampão 1: Hepes 10 mM pH 7,4; tampão 2: Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM; **b** – A percentagem de DMSO foi na maioria das vezes a indicada nesta tabela, à exceção do estudo descrito na secção 4.11 em que se utilizou 5% DMSO em todos os compostos.

Para além das amostras referidas foram preparados brancos, que continham todos os componentes exceto o composto. Foram também preparadas soluções dos compostos na mesma concentração que nas amostras com LUVs, no respetivo tampão e percentagem de DMSO mas sem lípido, que serviram como controlo. As medidas de fluorescência foram obtidas 10 min, 1 h e 4 h após a adição do composto às bicamadas lipídicas (condições experimentais - Tabela 2 e Tabela 3).

#### 4.11 Estudo do efeito dos compostos na bicamada lipídica, através da sonda Di-4-ANEPPS

Para estudar a interação dos compostos não fluorescentes foi necessário recorrer-se a uma sonda de membrana, Di-4-ANEPPS. Apesar da interação dos compostos fluorescentes com a membrana já se encontrar analisada, voltou-se a estudá-lo nesta etapa, para poder estabelecer uma comparação entre os resultados obtidos a partir da fluorescência intrínseca dos compostos que a possuem e da fluorescência extrínseca da sonda, aferindo se as propriedades fotofísicas desta estão de facto a refletir a interação dos compostos com a bicamada.

Usaram-se LUVs de DOPC na concentração final de 1 mM. Para possibilitar a comparação entre todos os compostos, optou-se por utilizar o tampão 1, uma vez que neste todos os compostos apresentam valores de solubilidade adequados à execução das experiências. Como os ligandos Salan (4-MeO e 5-MeO) necessitam de 5% DMSO em tampão 1, e uma vez que o efeito de 5% de DMSO nas bicamadas lipídicas foi avaliado antes deste estudo, usou-se para todos os compostos tampão 1 com 5% DMSO. A hidratação do lípido foi, então, feita com tampão 1 e com um volume tal que a concentração lipídica fosse 2 mM. Depois da preparação das LUVs, a suspensão foi dividida em alíquotas de 500  $\mu$ L e adicionada a sonda Di-4-ANEPPS. No dia seguinte procedeu-se à adição de 25  $\mu$ L de DMSO de modo a que as amostras contivessem 5% DMSO, composto e tampão 1 com 5% DMSO até ao volume final de 1 mL (obtendo-se uma concentração de lípido de 1 mM). A concentração de composto final foi de 20  $\mu$ M<sup>6</sup>, à exceção dos ligandos pbt e PPh<sub>3</sub>, em que esta foi reduzida para 10  $\mu$ M devido ao seu limite de solubilidade em tampão. Foi também preparado um controlo (com sonda, mas sem composto) e um branco (com composto mas sem sonda). Os compostos foram incubados durante 1 h com as bicamadas de DOPC e finalmente realizaram-se as medidas de fluorescência para os comprimentos de onda e fendas já referidos para o Di-4-ANEPPS (Tabela 2 e Tabela 3).

#### 4.12 Estudo da estabilidade das LUVs na presença dos compostos

A estabilidade das LUVs foi avaliada através da determinação do seu tamanho e potencial zeta na presença e ausência de composto. Estas medidas foram realizadas para os lípidos DOPC e DPPC e para a mistura DMPC:DMPG (7:3 mol:mol) (1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicerol-3-fosfocolina e 1,2-Dimiristoil-*sn*-3-fosfoglicerol, respetivamente). Os dois primeiros são lípidos zwitteriónicos (PC tem carga positiva – Tabela A. 2) e a mistura DMPC:DMPG ( $T_m \approx 23 - 25$  °C) é aniónica (PG tem carga nula – Tabela A. 2).

À semelhança das experiências anteriores os lípidos foram hidratados com um volume tal de tampão que a sua concentração fosse inicialmente de 2 mM. Para o estudo dos complexos (OR6, S8 e S10) a hidratação foi feita com o tampão 1, e para os ligandos (pbt, *bpy*, Salan 4-MeO, Salan 5-MeO e PPh<sub>3</sub>) com o tampão 2. Depois da extrusão as LUVs foram divididas por *ependorfs* (500  $\mu$ L) e ficaram a 4 °C durante a noite. No dia seguinte fez-se a adição de 10  $\mu$ L de DMSO para que as LUVs estivessem na presença de 2% DMSO (à exceção do estudo do OR6),

---

<sup>6</sup> Neste estudo como já não se está a seguir a fluorescência intrínseca do composto mas sim da sonda Di-4-ANEPPS, pode-se aumentar a concentração de composto uma vez que já não há problema de a sua absorvência ser superior a 0,1. O mesmo acontece para o estudo da estabilidade das LUVs na presença dos compostos (secção 4.12), uma vez que não se utilizaram estudos com base na fluorescência dos compostos.

do composto e do respetivo tampão com 2% DMSO (exceto para o OR6, em que o tampão não continha DMSO). No final das várias adições o lípido ficou numa concentração de 1 mM. A concentração dos compostos nas amostras foi 10  $\mu$ M para os ligandos pbt e PPh<sub>3</sub> e 20  $\mu$ M para os restantes compostos. Foram também preparados os respetivos brancos. Os compostos ficaram 1 h a incubar com as bicamadas lipídicas antes das medições dos tamanhos e potenciais zeta.

A determinação da distribuição de tamanhos da suspensão de lipossomas foi realizada por dispersão dinâmica de luz ou *Dynamic Light Scattering* (DLS) num aparelho ZetaSizer Nano S (princípio da técnica explicado na secção 3.3). Para medir a velocidade de difusão das partículas faz-se incidir uma radiação laser (hélio-néon, ou árgon) numa célula de plástico 1 cm X 1 cm contendo a amostra, a uma dada temperatura (25 °C).

O potencial zeta ( $\zeta$ ) foi medido utilizando um aparelho ZetaSizer Nano Z. Para isso fez-se uso de células de plásticos que contêm um pequeno capilar com um eletrodo em cada extremidade como as mostradas na Figura 22 B, (princípio da técnica elucidado na secção 3.4).

#### **4.13 Efeito dos compostos na permeabilidade da membrana**

O efeito dos compostos na permeabilidade da membrana foi avaliado através de um ensaio de *leakage*, i.e., de libertação da sonda (5,6)-carboxifluoresceína (CF) [85].

O procedimento experimental envolve a preparação de LUVs contendo CF apenas no seu interior, e para isso o lípido foi hidratado com tampão 1 contendo 40 mM de CF (pH 7,4). Após a extrusão, a CF não encapsulada foi separada das vesículas em suspensão através de uma filtração gel com uma coluna Sephadex G-75 e eluição com tampão Hepes 50 mM pH 7,4. Depois da eluição das LUVs (primeiras frações tipicamente de 500  $\mu$ L – confirmado através de espectro de absorção UV-Vis pelo aparecimento da banda de dispersão devida às LUVs), foi adicionado DMSO para que este ficasse a 2% (exceto para o estudo do OR6). Seguidamente as LUVs (concentração final de lípido 0,5 mM) foram divididas pelos diferentes poços de uma microplaca opaca e, em seguida, adicionaram-se os compostos de modo a ficarem na concentração final de 10  $\mu$ M. Em três poços foram, também, colocadas apenas LUVs (controlo). O volume final em cada poço foi de 250  $\mu$ L. A concentração de composto foi decidida tendo, mais uma vez, em conta a solubilidade dos compostos em tampão, apesar de ser possível atingir concentrações mais elevadas para alguns compostos, optou-se por preparar as soluções *stock* com concentrações tais que o volume adicionado para cada composto fosse o mesmo, para permitir o uso de uma pipeta automática com oito pontas. Assim, os diferentes compostos foram adicionados todos ao mesmo tempo às LUVs e, as leituras iniciadas após igual tempo depois da

adição. A concentração de composto efetivamente particionada na membrana depende do valor de  $K_p$  de cada um.

Depois da adição dos compostos iniciaram-se imediatamente as medidas de intensidade de fluorescência num leitor de microplacas SpectraMAX GeminiEM. As medidas de intensidade de fluorescência foram realizadas de 2 em 2 min ao longo de 12 h, a 25 °C. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram respetivamente 492 nm e 530 nm, com um filtro de corte a 515 nm.

No dia seguinte foi adicionado Triton X-100 a todos os poços na concentração final de 0,5% (m/m) e feitas onze medidas da intensidade de fluorescência. Como o Triton X-100 é um detergente não iónico, vai provocar a disrupção das LUVs e obtendo-se desta forma a percentagem máxima de libertação da CF ( $F_{100}$ ).

A percentagem de libertação (*leakage*) da CF foi calculada usando a Equação 13,  $F_f$  é o valor de intensidade de fluorescência em cada ponto,  $F_0$  é o valor de intensidade de fluorescência inicial (consideramos o primeiro ponto) e  $F_{100}$  é o valor de intensidade de fluorescência após a adição do Triton X-100 [85].

Equação 13

$$\% \text{ Leakage} = \frac{F_f - F_0}{F_{100} - F_0}$$

Assim, foi possível traçar a percentagem de *leakage* ao longo do tempo. Para descrever as curvas experimentais obtidas usou-se uma função exponencial (Equação 14) [86]. Para se obter um bom ajuste foram necessárias uma ou duas exponenciais, consoante os casos.

Equação 14

$$L = L_1 \left(1 - \exp\left(-t/t_{L1}\right)\right) + L_2 \left(1 - \exp\left(-t/t_{L2}\right)\right)$$

$L_1$  e  $L_2$  representam o *leakage* máximo associado a cada constante cinética,  $t$  é o tempo depois da adição dos compostos, e  $t_{L1}$  e  $t_{L2}$  são tempos de *leakage*. Foi também calculado o tempo médio de *leakage*,  $\langle t_L \rangle$ , através da Equação 15 [86], onde  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  são as componentes fracionárias normalizadas de *leakage* dadas pela Equação 16 (sendo  $L_{max} = L_1 + L_2$ ) [86].

Equação 15

$$\langle t_L \rangle = \alpha_1 \tau_{L1} + \alpha_2 \tau_{L2}$$

Equação 16

$$\alpha_i = \frac{L_i}{L_{max}}$$

#### 4.14 Determinação do coeficiente de partição membrana/água dos compostos

O coeficiente de partição dos compostos entre a solução aquosa e a membrana ( $K_p$ ) é definido pela Equação 18 [87]:

Equação 17

$$K_p = \frac{n_{CL}/V_L}{n_{CW}/V_W}$$

em que  $n_{Ci}$  são as moles de composto presente em cada fase (L = lípido e W = água) e  $V_i$  são os volumes das fases. Nesta tese este parâmetro foi determinado de dois modos: um recorrendo à fluorescência intrínseca dos compostos e outro através da sonda Di-4-ANEPPS (para os compostos não fluorescentes).

##### 4.14.1 Determinação do $K_p$ através da fluorescência intrínseca dos compostos

Os valores de  $K_p$  dos ligandos pbt, salan 4-MeO e 5-MeO e do complexo OR6 foram determinados através da variação da concentração de lípido (0 a 3 mM) em suspensões de LUVs de DOPC e com uma concentração constante de composto.

As LUVs foram preparadas numa concentração *stock* de 5 e 2 mM de lípido, sendo depois adicionado, no dia seguinte, o volume necessário de DMSO para uma percentagem de 2% DMSO nas amostras (exceto no caso do OR6). Depois foram feitas diluições para as concentrações 3; 2; 2,5; e 1,5 mM a partir da suspensão de lípido 5 mM e para as concentrações de 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1 mM a partir da suspensão 2 mM. As diluições foram realizadas com a adição do tampão respetivo (tampão 1 para o complexo OR6 e tampão 2 com 2% DMSO para os ligandos) e com a adição do composto para um volume final de 1 mL. A concentração de composto manteve-se constante ao longo das diferentes concentrações de lípido, estando estas representadas na Tabela 4. Os compostos foram deixados a incubar durante 1h com as bicamadas de DOPC e depois realizadas medidas de intensidade de fluorescência em estado estacionário para cada amostra, aos comprimentos de onda de excitação e emissão máximos para cada composto (Tabela 3). As fendas utilizadas foram as mesmas que para os espectros, referidas na Tabela 2.

Os dados obtidos foram analisados de acordo com a Equação 18, onde  $I$  é a intensidade de fluorescência a cada concentração,  $I_L$  é a intensidade de fluorescência do composto no lípido (limite para o qual todo o composto se encontra particionado para a membrana),  $[L]$  é a concentração de lípido,  $I_W$  é a intensidade de fluorescência do composto em solução aquosa



(tampão respetivo),  $[W]$  é a concentração molar da água na suspensão lipídica que se considera igual à da água pura a 25 °C (55,3 mol/L) [87].

*Equação 18*

$$I = \frac{I_L \times K_p \times [L] + I_W \times [W]}{[W] + K_p \times [L]}$$

Os parâmetros  $K_p$  e  $I_L$  foram obtidos através do ajuste da Equação 18 aos dados experimentais, sendo  $I_W$  considerado o valor da intensidade do primeiro ponto (sem lípido). O ajuste foi realizado através dum método de regressão não linear de mínimos quadrados.

Depois de determinado o  $K_p$  foi possível determinar a fração de composto,  $x_c$ , na membrana para cada concentração de lípido, através da Equação 19:

*Equação 19*

$$x_c = \frac{K_p \times [L]}{[W] + K_p \times [L]}$$

#### 4.14.2 Determinação do $K_p$ através da fluorescência da sonda Di-4-ANEPPS

Este protocolo foi usado para os compostos não fluorescentes, ligando  $PPh_3$  e complexo S8, ou com pouca fluorescência como o caso do complexo S10 e do ligando *bpy*.

Neste caso a concentração de lípido (DOPC) e de sonda manteve-se constante em cada ensaio, sendo alterada a concentração de composto. A partição de composto para a membrana é, neste caso, determinada a partir da variação da intensidade de fluorescência da sonda como consequência do aumento sucessivo de concentração de composto na membrana. Prepararam-se LUVs com uma concentração de 1, 2 e 3 mM em tampão 1 (complexos S8 e S10) e tampão 2 (ligandos *bpy* e  $PPh_3$ ). Depois da extrusão foi adicionada a sonda. No dia seguinte procedeu-se à adição de DMSO (2%), à adição de composto e à adição do respetivo tampão 2% DMSO. Depois da adição de todos os componentes obtiveram-se soluções com concentrações de lípido de 0,2; 0,5; 1; 1,5 e 2,5 mM. A adição de composto foi feita de modo a obter-se a maior gama possível de concentrações, limitada essencialmente pela solubilidade de cada composto, sendo as gamas de concentrações as seguintes: para o S8 de 0 a 22  $\mu$ M; para o S10 de 0 a 24  $\mu$ M; para o *bpy* de 0 a 88  $\mu$ M; e para o  $PPh_3$  de 0 a 14  $\mu$ M. Os compostos foram deixados a incubar durante 1 h e seguidamente as amostras foram divididas em vários poços de uma microplaca. As leituras foram realizadas no leitor de microplacas. Os comprimentos de onda de emissão e excitação foram os já anteriormente usados para o Di-4-ANEPPS (Tabela 3).

Os resultados obtidos mostraram a ocorrência de *quenching* da sonda Di-4-ANEPPS. Os dados experimentais foram ajustados à Equação 20 [88]:

Equação 20

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q]$$

onde  $I_0$  e  $I$  são a intensidade de fluorescência do Di-4-ANEPPS, respetivamente, na ausência e presença de composto,  $K_{SV}$  é a constante de *Stern-Volmer* e  $[Q]$  é a concentração de *quencher* (espécie que provoca a diminuição da intensidade de fluorescência do Di-4-ANEPPS, neste caso o composto em estudo). No entanto, neste caso, o *quencher* é distribuído entre a membrana e a fase aquosa, sendo que apenas as moléculas de *quencher* na membrana,  $[Q]_m$ , serão efetivamente responsáveis pelo *quenching*. Tendo  $[Q]_T = [Q]_m + [Q]_a$ ,  $T$  e  $a$  em índice representam total e água relativamente à concentração de *quencher*, a Equação 20 pode ser reescrita da seguinte forma [88]:

Equação 21

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}^{ap}[Q]_T$$

em que  $K_{SV}^{ap}$  é a constante aparente de *Stern-Volmer*. Esta constante é retida através de um ajuste linear ou polinomial aos valores de  $\frac{I_0}{I}$  das várias concentrações de *quencher*. Este valor depende da eficiência do composto em diminuir a fluorescência da sonda, mas, também, do seu  $K_p$ . A relação entre o  $K_{SV}^{ap}$  e o  $K_p$  é dada pela Equação 22 [88]:

Equação 22

$$K_{SV}^{ap} = K_{SV} \frac{K_p}{K_p \alpha_m + (1 - \alpha_m)}$$

sendo  $\alpha_m$  a fração de volume da fase lipídica ( $\alpha_m = V_m/V_T$ ,  $V_m$  é o volume da fase lipídica e  $V_T$  o volume total). Considerando  $V_m \ll V_T$ , a Equação 22 é simplificada na Equação 23 [88]:

Equação 23

$$K_{SV}^{ap} = K_{SV} \frac{K_p}{K_p V_m + 1}$$

Depois de conhecida a constante  $K_{SV}^{ap}$  para cada concentração de lípido, o valor de  $K_p$  pode ser retirado através do ajuste da Equação 23 (método de regressão não linear dos mínimos quadrados).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da reatividade dos compostos em solução

Esta secção do trabalho engloba o estudo da solubilidade e estabilidade dos compostos, e ainda avaliação da sua fluorescência intrínseca nos tampões 1 e 2. Nesta primeira etapa estudaram-se não só os complexos (S8 e S10), bem como os seus ligandos (pbt, *bpy*, Salan 4-MeO e 5-MeO, e PPh<sub>3</sub>) e precursores ([Ru(*bpy*)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] e [Ru(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>]). Para o complexo OR6 estes estudos já se encontravam realizados [15]. Estes ensaios foram imprescindíveis para otimizar as condições experimentais e obter resultados reprodutíveis nas experiências seguintes.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados obtidos no estudo de solubilidade.

**Tabela 5:** Solubilidade à temperatura ambiente dos complexos de Ruténio e dos seus ligandos e precursores (expressa em concentração máxima sem ocorrência de precipitação), em DMSO e nos tampões 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM).

Composto	DMSO (mM)	Tampão 1 (μM)	Tampão 2 (μM)
<b>OR6</b>	-----	3000 [18]	Insolúvel <sup>a</sup> (precipita) [18]
<b>pbt</b>	11	29 (2% DMSO)	
<b><i>bpy</i></b>	17	169 (2% DMSO)	
<b>[Ru(<i>bpy</i>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	27	266 (1% DMSO)	
<b>S8</b>	3	55 (2% DMSO)	Insolúvel <sup>a</sup> (precipita)
<b>Salan 4-MeO</b>	14	277 (5% DMSO) <sup>b</sup>	277 (2% DMSO)
<b>S10</b>	3	61 (2% DMSO)	Insolúvel (precipita)
<b>Salan 5-MeO</b>	14	277 (5% DMSO)	277 (2% DMSO)
<b>PPh<sub>3</sub></b>	13	33 (2% DMSO)	
<b>[Ru(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>]</b>	13	33 (2% DMSO)	

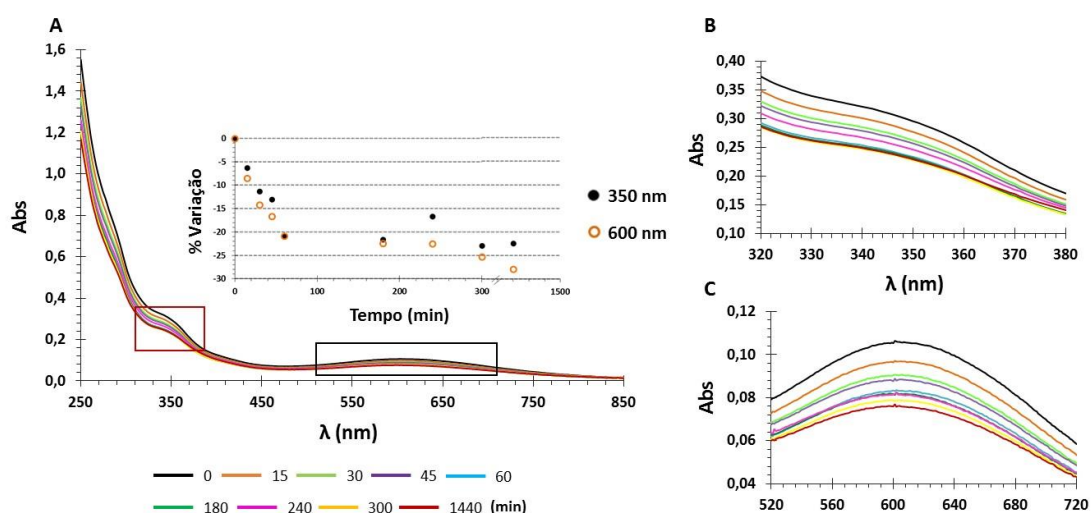
**a** - O termo “insolúvel” é usado para compostos com solubilidade inferior à necessária para os estudos pretendidos; **b** – Os termos “2% e 5% DMSO” referem-se à percentagem v/v de DMSO necessária para a solubilização do composto em solução aquosa.

À exceção do complexo OR6 [15], nenhum outro composto se dissolve apenas em tampão e por isso foi necessário usar o DMSO como co-solvente, sendo a percentagem máxima usada de 5% (v/v). Para outros complexos de Ru(II) com ligandos *bpy*, tal como o complexo OR6, existem estudos com o DNA e com proteínas em que não houve necessidade de qualquer co-solvente para a solubilização destes compostos em soluções tamponadas [89,90]. Por outro lado, a necessidade de usar DMSO para a solubilização dos restantes compostos já era esperada, uma vez que já se encontra descrita na literatura para alguns dos compostos usados ou para

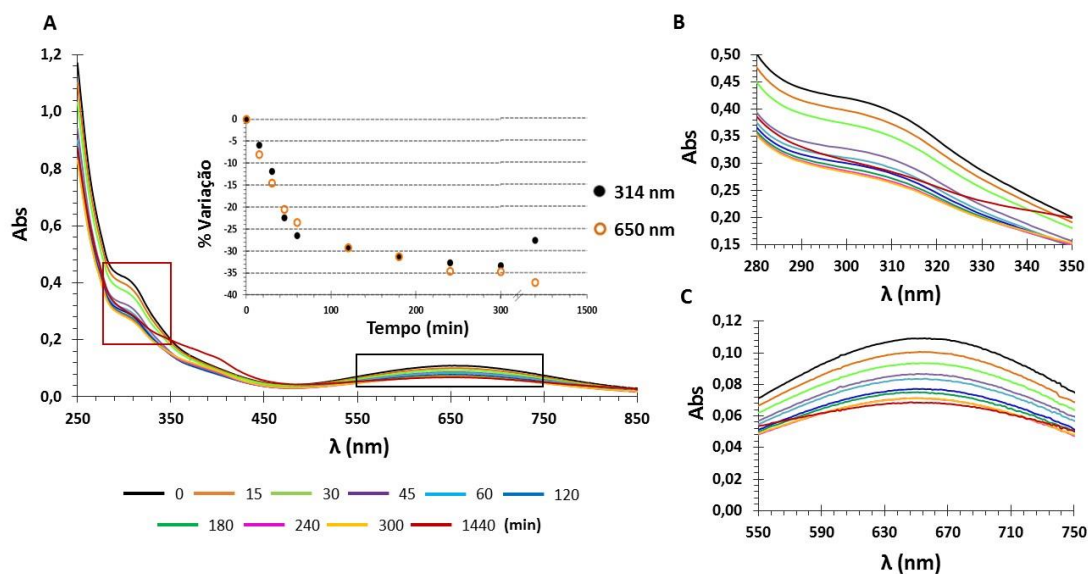
compostos semelhantes. Por exemplo para os complexos S8 e S10 em estudos de interação com a HSA foi, também, necessário 2% DMSO [16]. No mesmo trabalho foi também avaliada a citotoxicidade dos complexos S8 e S10 e dos seus ligandos e em todos os ensaios o DMSO foi usado como co-solvente [16]. Também outros compostos com um centro metálico diferente (titânio), mas com ligandos do tipo Salan usados em estudos de viabilidade celular necessitaram de até 1% DMSO [91].

De salientar ainda que se observou, visualmente, que os complexos S8 e S10 (e OR6 já observado em estudos anteriores [15]) precipitam em tampão 2, situação também confirmada espectralmente pelo aumento da absorvência residual devido à dispersão de luz provocada pela turbidez da amostra. Pode ver-se em anexo, na Figura A. 2, a título de exemplo, um espectro em que os resultados indicam que há precipitação do complexo S8 em tampão 2.

Depois de definidas as concentrações máximas possíveis de cada composto em solução, fizeram-se estudos de estabilidade ao longo do tempo (apenas os compostos sintetizados no Laboratório de Química Organometálica foram alvos deste estudo). Nas figuras seguintes apresentam-se os espectros de absorção Uv-Vis ao longo do tempo dos complexos S8 (Figura 23) e S10 (Figura 24) em tampão 1 e dos ligandos Salan 4 – MeO (Figura 25 e Figura 26) e Salan 5 – MeO (Figura 27 e Figura 28) em ambos os tampões. Os espectros dos precursores  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$  e  $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}_2]$  encontram-se no anexo 9.3.



**Figura 23:** Estudo de estabilidade do complexo S8,  $C_{S8} = 55 \mu\text{M}$ , em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) com 2% DMSO. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 350 nm (banda intra-ligando  $\text{PPh}_3$ ) e 600 nm (banda LMCT); **B** – Zoom da zona rodeada a vermelho no gráfico A (320 – 380 nm); **C** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (520 – 720 nm).

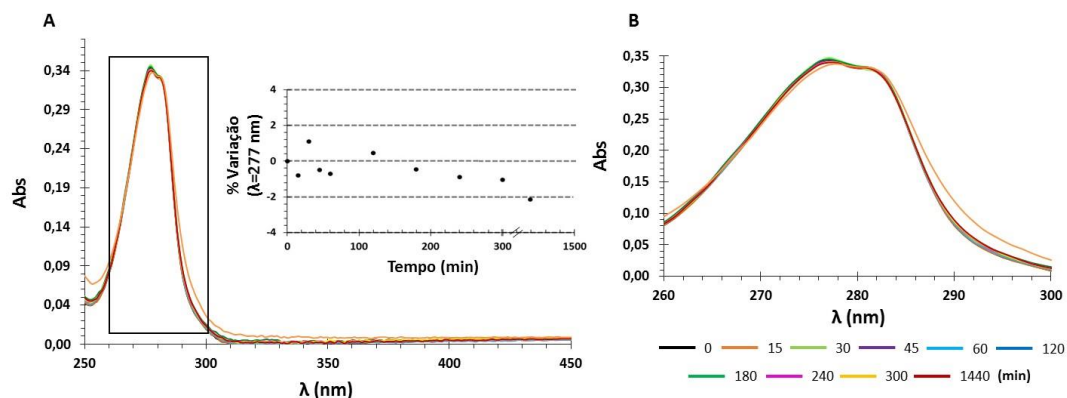


**Figura 24:** Estudo de estabilidade do complexo S10,  $C_{S10} = 61 \mu\text{M}$ , em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) com 2% DMSO. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 315 nm (banda intra-ligando  $\text{PPh}_3$ ) e 650 nm (banda LMCT); **B** – Zoom da zona rodeada a vermelho no gráfico A (280 – 350 nm); **C** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (550 – 750 nm).

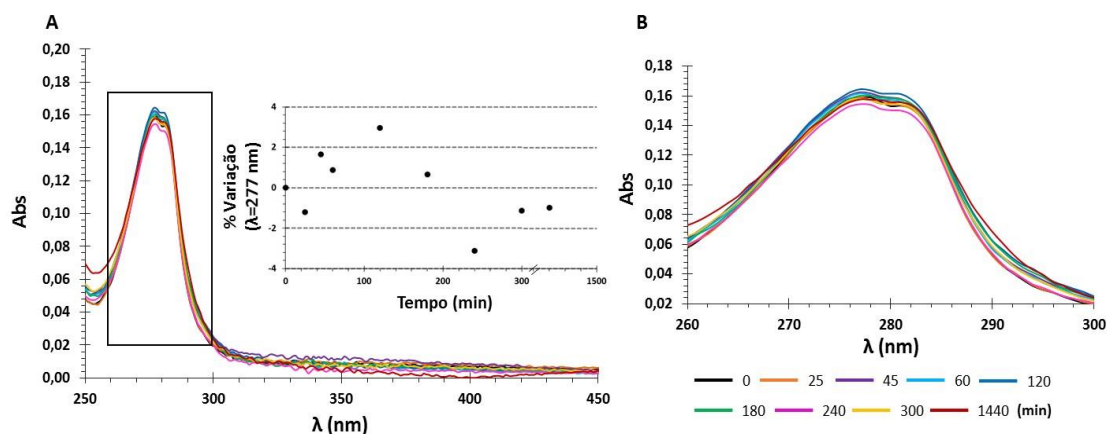
Nos espectros de absorção dos complexos S8 (Figura 23) e S10 (Figura 24) em tampão 1, são visíveis bandas na região do visível, respetivamente a 600 e 650 nm. Estas bandas são características de uma transição de carga entre o ligando e o metal (LMCT) em complexos de Ru(III) [92]. Há também absorção na zona do UV, que normalmente são bandas devidas a transições intra-ligando [16,89,93]. No espectro do complexo S8 é visível uma banda a aproximadamente 350 nm, e no complexo S10 a cerca de 314 nm. Para estes complexos, há espectros publicados em DMSO e em diclorometano, onde a banda LMCT é atribuída a uma transição de carga  $\text{O}_{\text{fenol}} \rightarrow \text{Ru(III)}$ ; no entanto as bandas LMCT em DMSO e diclorometano aparecem a comprimentos de onda menores [16], o que é justificado pela diferença de polaridade dos solventes.

Relativamente aos ligandos, o Salan 4-MeO (Figura 25 e Figura 26) apresenta um máximo de absorção a cerca de 277 nm em ambos os tampões e o Salan 5-MeO (Figura 27 e Figura 28) a 290 nm. Uma analogia rápida permite concluir que as bandas a 350 nm e 314 nm presentes nos complexos S8 e S10, respetivamente, não são bandas devidas às transições intra-ligando Salan, uma vez que estes apresentam uma banda, nas mesmas condições, mais energética. Essas bandas são atribuídas a transições intra-ligando  $\text{PPh}_3$ , o que é suportado pela presença de um “ombro” entre os 300 e 350 nm no precursor  $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)\text{Cl}_2]$  em tampão 1, Figura A. 5. Deste modo a absorção nos complexos S8 e S10 abaixo dos 300 nm terá a assinatura de transições entre as orbitais dos ligandos Salan 4-MeO e 5-MeO. Esta atribuição é apoiada pelo descrito para estes complexos noutros solventes [16].

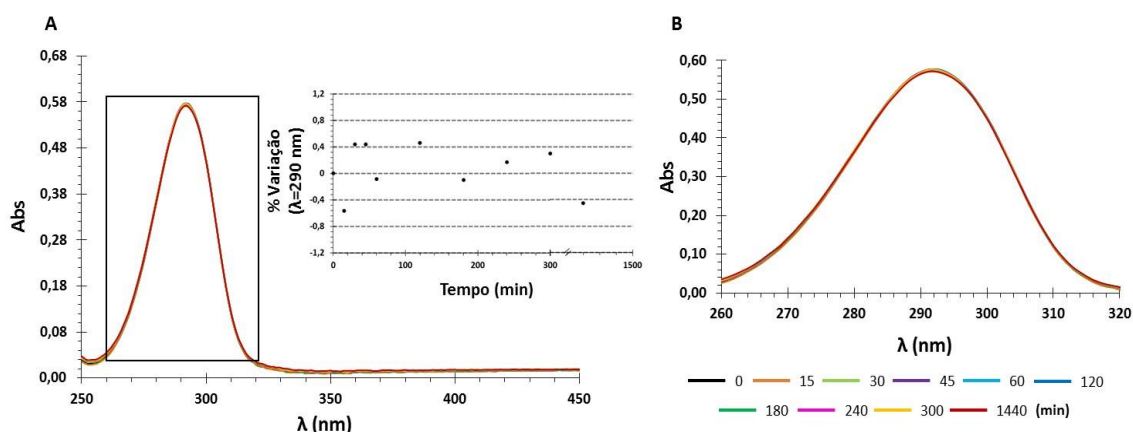
## RESULTADOS



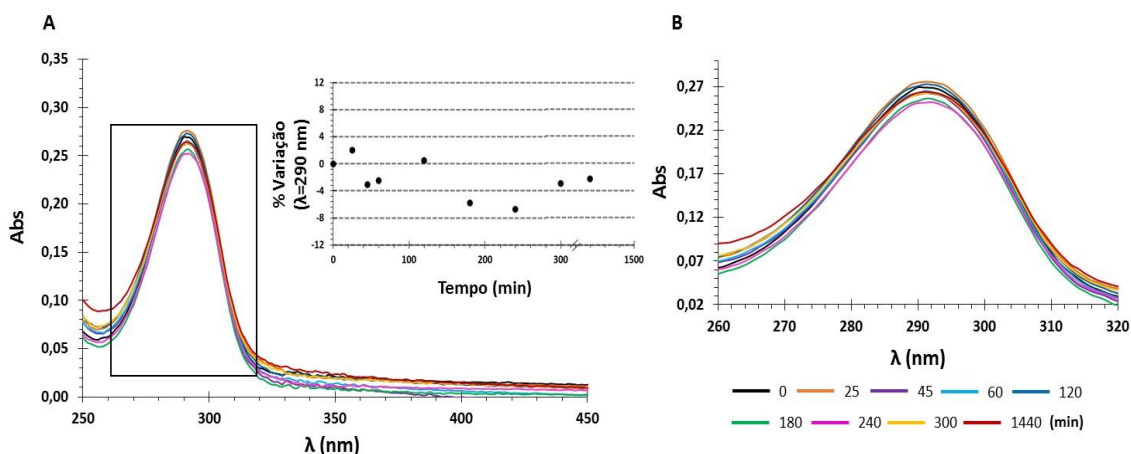
**Figura 25:** Estudo de estabilidade do ligando Salan 4-MeO,  $C_{\text{Salan 4-MeO}} = 100 \mu\text{M}$ , em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) com 5% DMSO. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 277 nm; **B** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (260 – 300 nm).



**Figura 26:** Estudo de estabilidade do ligando Salan 4-MeO,  $C_{\text{Salan 4-MeO}} = 40 \mu\text{M}$ , em tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) com 2% DMSO. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 277 nm; **B** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (260 – 300 nm).



**Figura 27:** Estudo de estabilidade do ligando Salan 5-MeO,  $C_{\text{Salan 5-MeO}} = 100 \mu\text{M}$ , em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) com 5% DMSO. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 290 nm; **B** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (260 – 320 nm).



**Figura 28:** Estudo de estabilidade do ligando Salan 5-MeO,  $C_{\text{Salan 5-MeO}} = 40 \mu\text{M}$ , em tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) com 2% DMSO. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 290 nm; **B** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (260 – 320 nm).

Tendo por base os resultados dos estudos de estabilidade foi possível definir um tempo de incubação para cada composto antes da sua adição às membranas, de modo a que os estudos envolvendo bicamadas lipídicas não fossem afetados pela química em solução aquosa dos compostos. Por exemplo, para os complexos S8 e S10 definiu-se um tempo de 12 h antes da sua adição às LUVs. Este procedimento justifica-se com base nas curvas de estabilidade (Figura 23 e Figura 24) que mostram variações apreciáveis apenas durante as primeiras 5 h do período de observação utilizado (24 h). Optou-se por uma incubação de 12 h por esta permitir preparar as soluções no dia anterior às medições (incubação durante a noite). Os restantes compostos são bastantes estáveis, apresentando percentagens de variação inferior a 8%, portanto definiu-se que não necessitam de incubação prévia. Para os dois precursores não são apresentados tempos de pré-incubação uma vez que ainda não se realizaram estudos de interação destes com as bicamadas lipídicas (Tabela 6).

No caso dos ligandos Salan foi possível seguir a estabilidade nos dois tampões. Observa-se que para ambos os ligandos as variações são ligeiramente menores em tampão 1, no entanto não se pode concluir se será um efeito do tampão ou do DMSO, uma vez que o estudo em tampão 1 foi realizado na presença de uma maior percentagem do co-solvente. Como não se considerou haver uma diferença significativa na estabilidade, escolheu-se na maioria das vezes o tampão 2 para os estudos seguintes, uma vez que contém NaCl e assim há uma melhor mimetização das condições fisiológicas. A informação acerca do tampão utilizado em cada experiência já foi mencionada no capítulo 4.

Finalmente, a avaliação da fluorescência intrínseca dos compostos em solução permitiu concluir que o complexo S8 não é fluorescente, bem como o ligando  $\text{PPh}_3$  e os precursores  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$  e  $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}_2]$ , pelo que para o estudo da interação destes com LUVs recorreu-se

à fluorescência extrínseca da sonda Di-4-ANEPPS. Os restantes compostos são fluorescentes; no entanto o complexo S10 é pouco fluorescente, uma vez que a intensidade máxima observada é cerca de duas ordens de grandeza inferior àquela que se observa para os outros compostos e sondas, utilizando a mesma largura de banda na excitação e na emissão. Na literatura há referência a vários tipos de complexos de ruténio fluorescentes que se podem associar aos aqui estudados, nomeadamente do complexo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  e também de complexos do tipo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}_2]^{2+}$  ou  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}']^{2+}$ , em que L' é um ligando bidentado, como no caso do pbt no complexo OR6 [90,94,95].

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho encontram-se resumidos na Tabela 6.

**Tabela 6:** Percentagem de variação (Equação 12) máxima observada para cada composto nos tampões 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e 2 (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM); Tempo de incubação usado antes da adição à suspensão de LUVs para cada composto; Comprimentos de onda de excitação e emissão a que corresponde o máximo de intensidade nos espectros dos compostos que apresentam fluorescência intrínseca. A percentagem de DMSO usada foi, para cada composto, a referida na Tabela 5.

Composto	% Variação <sub>max</sub> Tampão 1 <sup>a</sup>	% Variação <sub>max</sub> Tampão 2 <sup>a</sup>	Tempo de incubação	Fluorescência intrínseca	$\lambda_{\text{ex}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)
OR6	< 2% (24 h) [15]	-----	-----	✓	312	380
pbt	-----	-----	-----	✓	310	372
bpy	-----	-----	-----	✓	280	320
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$	> 80% (24 h)	≈ 50% (24 h)	-----	X	-----	-----
S8	< 28% (24 h)	-----	12h	X	-----	-----
Salan 4-MeO	< 3% (24 h)	< 4% (24 h)	-----	✓	277	304
S10	< 37% (24 h)	-----	12h	✓	290	340
Salan 5-MeO	< 1% (24 h)	< 8 % (24 h)	-----	✓	290	328
PPh3	-----	-----	-----	X	-----	-----
$[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}_2]$	< 35% (24 h)	≈ 50% (24 h)	-----	X	-----	-----

a – Por vezes a percentagem de variação foi medida a mais do que um comprimento de onda, aqui o termo “% variação<sub>max</sub>” refere-se à percentagem máxima observada, independentemente do comprimento de onda à qual foi medida.

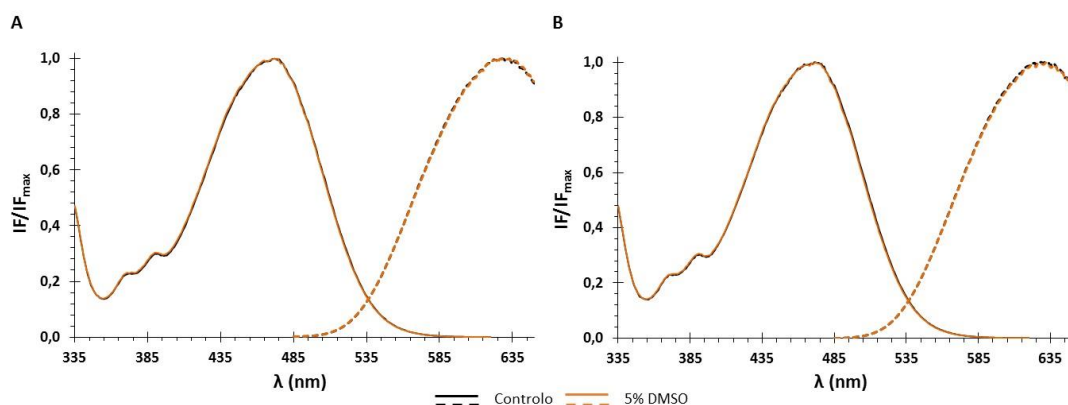
## 5.2 Efeito do DMSO em bicamadas lipídicas de DOPC e DPPC

A necessidade do uso do DMSO como co-solvente levanta a questão do eventual efeito deste nas bicamadas. Assim, decidiu-se estudar o efeito de 5% DMSO, i.e., a concentração máxima utilizada, em bicamadas lipídicas de DOPC e DPPC. Para reportar os efeitos provocados pelo DMSO avaliaram-se os parâmetros fotofísicos das sondas de membrana (DPH, *t*-PnA e Di-4-ANEPPS) que foram, ou irão, ser utilizadas em trabalhos futuros para estudar os efeitos dos

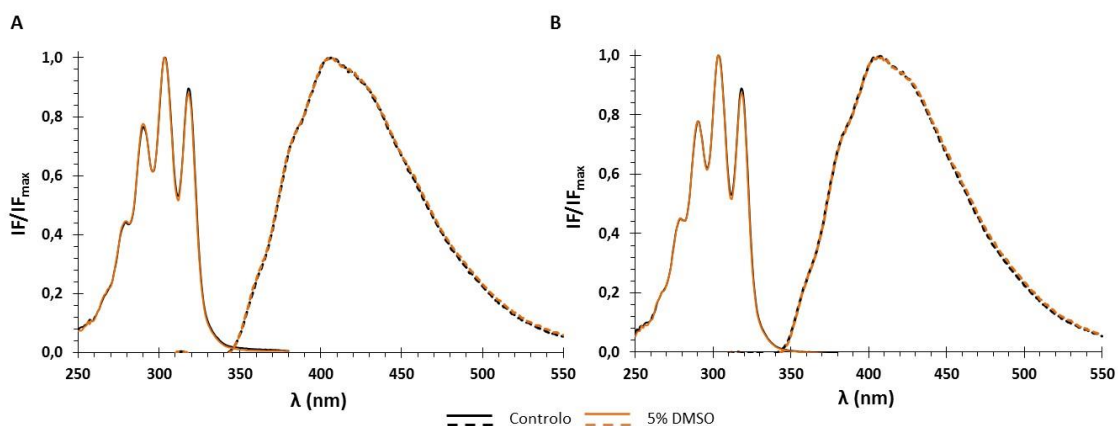


compostos de rutênio nas propriedades biofísicas das bicamadas. O estudo foi realizado nos dois tampões, 1 e 2.

Nas figuras seguintes, Figura 29, Figura 30 e Figura 31, estão representados os espectros de excitação e emissão das três sondas usadas em bicamadas de DOPC na presença e ausência de DMSO, nos dois tampões. Nenhum dos espectros apresenta desvios significativos na presença de DMSO (espectros a laranja).

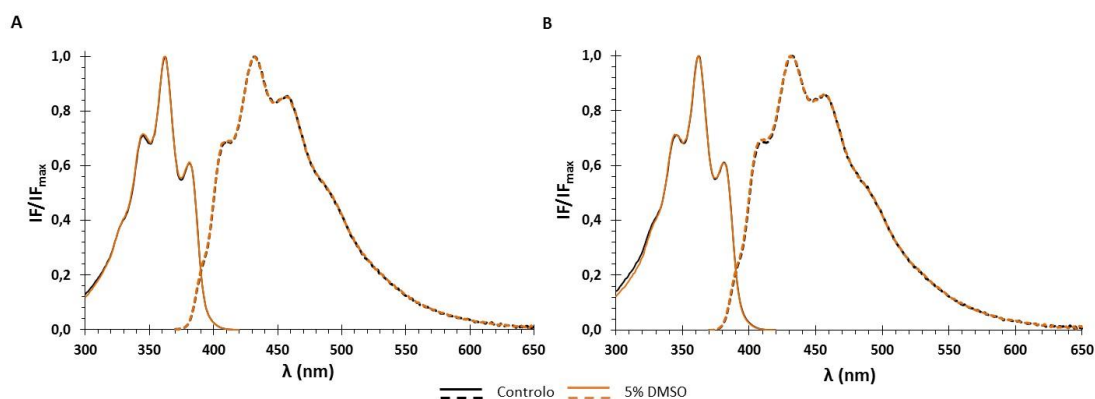


**Figura 29:** Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do DPH em LUVs de DOPC, na ausência de DMSO a preto (controle) e na presença de 5% DMSO a laranja: **A** – Estudo realizado com o tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4); **B** – Estudo realizado com o tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM).



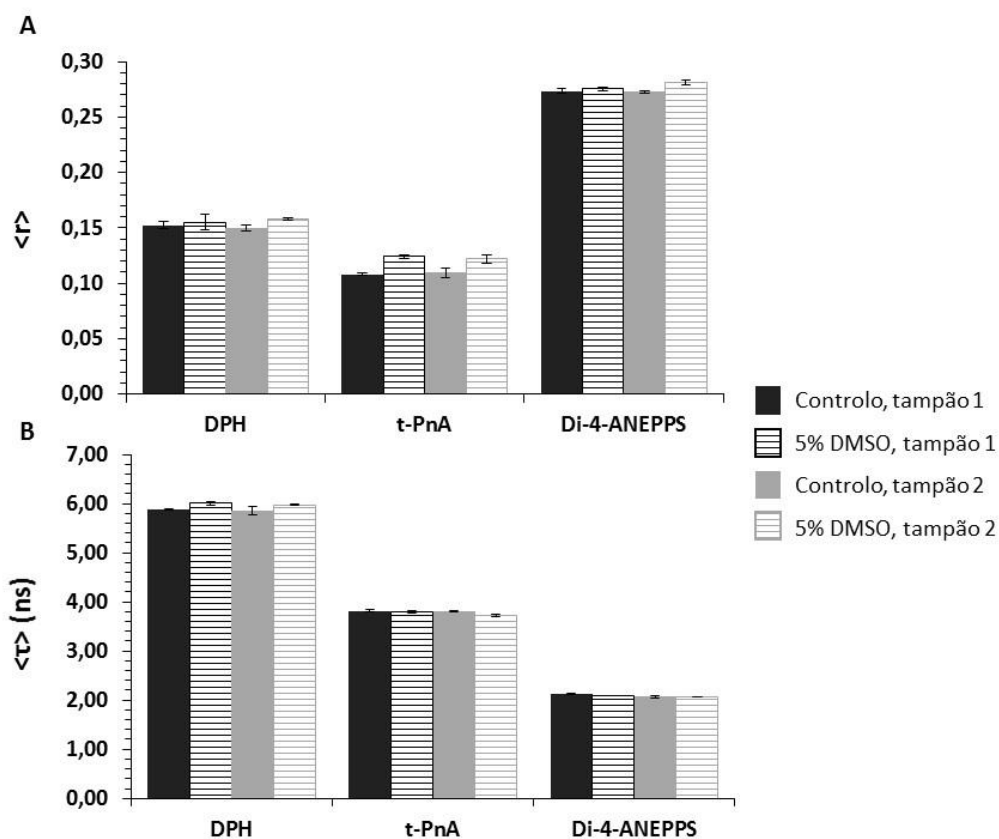
**Figura 30:** Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do t-PnA em LUVs de DOPC, na ausência de DMSO a preto (controle) e na presença de 5% DMSO a laranja: **A** – Estudo realizado com o tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4); **B** – Estudo realizado com o tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM).

## RESULTADOS



**Figura 31:** Espectros normalizados de excitação (linha cheias) e emissão (linhas tracejadas) do Di-4-ANEPPS em LUVs de DOPC, na ausência de DMSO a preto (controle) e na presença de 5% DMSO a laranja: **A** – Estudo realizado com o tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4); **B** - Estudo realizado com o tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM).

Obtiveram-se também medidas de anisotropia ( $\langle r \rangle$ ) em estado estacionário e tempos de vida médios de fluorescência ( $\langle \tau \rangle$ ). Os resultados apresentados na Figura 32 referem-se a valores de anisotropia de fluorescência em estado estacionário (A) e de tempo médio de vida de fluorescência (B) em DOPC.

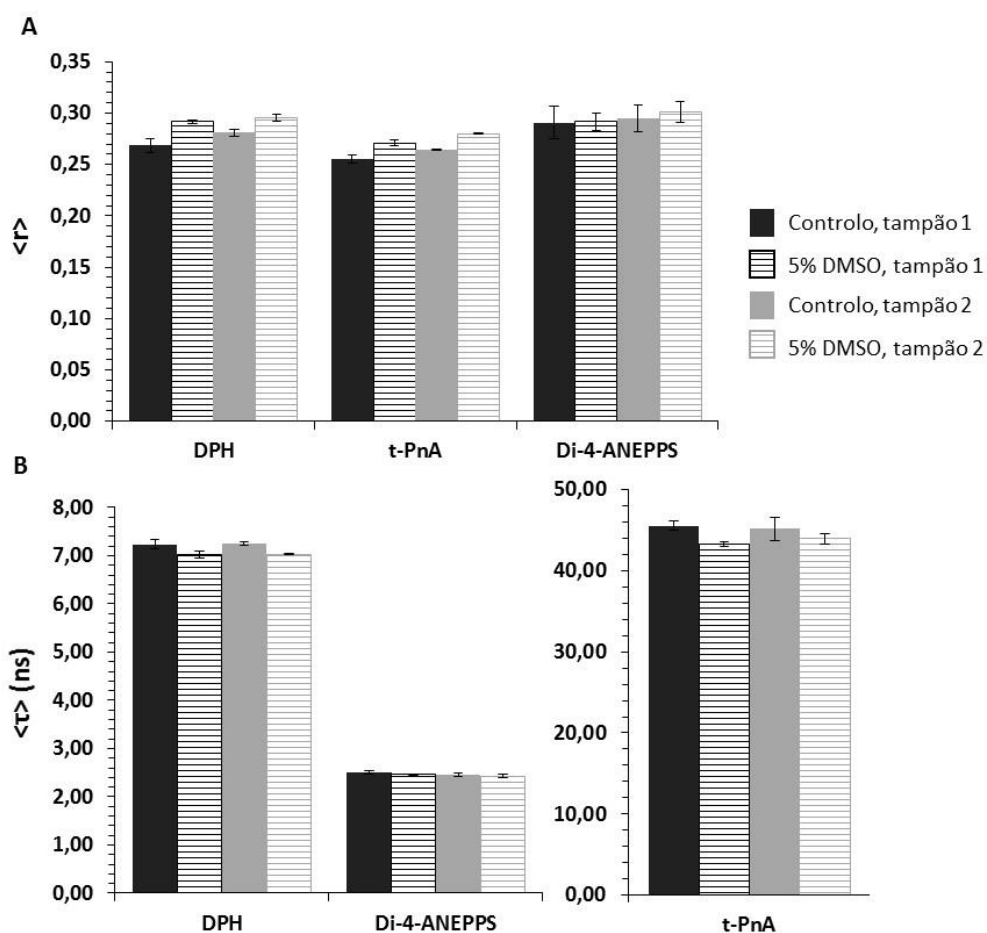


**Figura 32:** Efeito de 5% DMSO em LUVs de DOPC: **A** - Anisotropia de fluorescência em estado estacionário,  $\langle r \rangle$ , das diferentes sondas na ausência e presença de DMSO, nos dois tampões; **B** – Tempo de vida médio de fluorescência,  $\langle \tau \rangle$ , das três sondas usadas na ausência e presença de DMSO, nos dois tampões. “Controle” refere-se a amostras que não contêm DMSO.

Pode-se observar que há um aumento da anisotropia de fluorescência (Figura 32 A) na presença do DMSO em ambos os tampões mais acentuado na sonda *t*-PnA (13 e 10%, respectivamente nos tampões 1 e 2). Para as outras duas sondas, no tampão 1 não se observam diferenças significativas, e no tampão 2 apenas há um ligeiro aumento de 2% na anisotropia do Di-4-ANEPPS e 5% na do DPH. Relativamente aos tempos de vida médios (Figura 32 B), observa-se um ligeiro aumento (2%) na presença de 5% DMSO no caso da sonda DPH em ambos os tampões. Para as outras duas sondas este parâmetro biofísico não se altera significativamente na presença de DMSO.

Este estudo foi também realizado para bicamadas de DPPC, à semelhança do que aconteceu no estudo com o DOPC não se observam desvios nos espectros de excitação e emissão das três sondas na presença de 5% DMSO. Os espectros estão apresentados no anexo 9.4.

Na Figura 33 estão representadas a anisotropia de fluorescência (A) e o tempo médio de vida (B) das três sondas em DPPC.



**Figura 33:** Efeito de 5% DMSO em LUVs de DPPC: **A** - Anisotropia de fluorescência em estado estacionário,  $\langle r \rangle$ , das diferentes sondas na ausência e presença de DMSO, nos dois tampões; **B** – Tempo de vida médio de fluorescência,  $\langle \tau \rangle$ , das três sondas usadas na ausência e presença de DMSO, nos dois tampões. Controlo refere-se a amostras que não contêm DMSO.

Observa-se que na presença de 5% DMSO há um aumento na anisotropia de fluorescência do DPH de 8% e 5% nos tampões 1 e 2 respetivamente. No mesmo parâmetro do *t*-PnA há um aumento de 6% em ambos os tampões. Já o tempo de vida médio destas duas sondas diminui na presença de DMSO. No tampão 1 há uma diminuição de 3% no DPH e de 5% no *t*-PnA. No tampão 2 há uma diminuição de 3% para as duas sondas. Nos parâmetros biofísicos da sonda Di-4-ANEPPS não há diferenças, dentro do erro experimental, na presença de DMSO.

Os resultados deste estudo encontram-se sistematizados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Sistematização do efeito provocado por 5% DMSO na anisotropia de fluorescência,  $\langle r \rangle$ , e no tempo de vida médio,  $\langle \tau \rangle$ , das sondas de membrana DPH, *t*-PnA e Di-4-ANEPPS.

	DOPC	Tampão 1	Tampão 2
$\langle r \rangle$	DPH	< erro	↑ 5%
	<i>t</i> -PnA	↑ 13%	↑ 10%
	Di-4-ANEPPS	< erro	↑ 2%
$\langle \tau \rangle$	DPH	↑ 2%	↑ 2%
	<i>t</i> -PnA	< erro	< erro
	Di-4-ANEPPS	< erro	< erro
	DPPC	Tampão 1	Tampão 2
$\langle r \rangle$	DPH	↑ 8%	↑ 5%
	<i>t</i> -PnA	↑ 6%	↑ 6%
	Di-4-ANEPPS	< erro	< erro
$\langle \tau \rangle$	DPH	↓ 3%	↓ 3%
	<i>t</i> -PnA	↓ 5%	↓ 3%
	Di-4-ANEPPS	< erro	< erro

Relativamente aos parâmetros fotofísicos (máximos de excitação e emissão, anisotropia e tempo de vida médio) das três sondas utilizadas nos sistemas controlo, tanto em DOPC como DPPC, pode-se dizer que estão em boa concordância com outros estudos em que se utilizaram sistemas semelhantes:

O DPH apresenta espectros de excitação e emissão típicos mencionados na literatura [69]. O espectro de excitação é caracterizado por uma banda com três picos, resultantes de transições para diferentes níveis vibracionais do estado excitado. O espectro de emissão segue a regra da “imagem no espelho” e apresenta, também uma banda de emissão com três picos. Esta similaridade entre os espectros de excitação e emissão ocorre porque a excitação não altera drasticamente a geometria nuclear e, consequentemente, o espaçamento entre os níveis vibracionais do estado excitado são semelhantes aos do estado fundamental [69]. Relativamente aos valores de anisotropia, há um grande aumento quando se comparam os valores das amostras controlo em DOPC e em DPPC. A anisotropia do DPH aumenta de 0,15 em

DOPC para 0,27 em DPPC. Como já foi referido na introdução, esta sonda é bastante sensível à reorientação angular das cadeias acilo dos lípidos e apresenta elevados valores de anisotropia na ausência de rotação, o que acontece em sistemas lipídicos na fase gel [60]. Por outro lado, o tempo médio de vida desta sonda é um parâmetro menos sensível a variações nas fases lipídicas [57] o que explica a menor diferença relativa (comparativamente aos valores de anisotropia) entre os tempos de vida desta sonda em DOPC (5,89 ns) e em DPPC (7,24 ns).

Em relação ao *t*-PnA, o espectro de excitação é, também, caracterizado pela existência de três picos resultantes da progressão vibracional, embora apresente um espectro de emissão sem progressão vibracional com um máximo a ca. 405 nm. A não obediência à regra da imagem no espelho para esta sonda tem sido atribuída a uma transição direta para o segundo estado singuleto excitado ( $S_2$ ), devido a uma proibição por simetria da transição  $S_0 \rightarrow S_1$  e a uma conversão interna muito rápida de  $S_2$  para  $S_1$  antes da emissão.

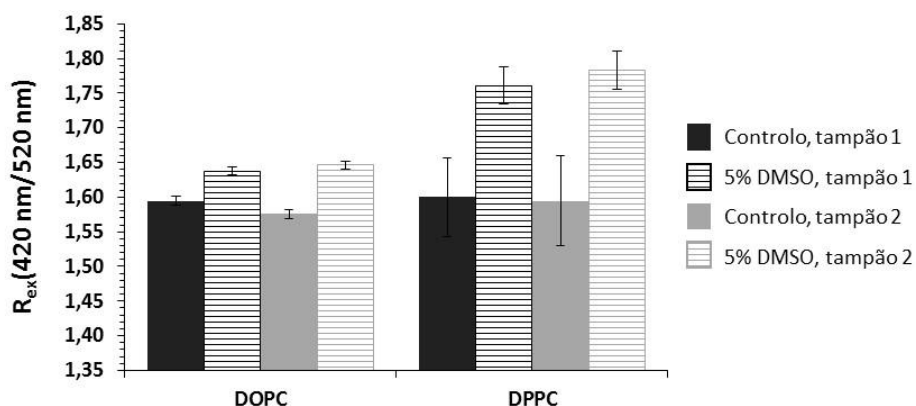
Também os valores de anisotropia e tempo de vida médio obtidos estão em boa concordância com os de diversos autores, com valores de anisotropia em DOPC de cerca de 0,10 e em DPPC de 0,26, e de tempo médio de vida de 3,81 e 45,55 ns, em DOPC e DPPC respetivamente [38,57].

A sonda Di-4-ANEPPS apresenta um máximo de excitação a 472 nm de emissão a 630 nm, consistente com estudos anteriores [68]. Quanto à anisotropia de fluorescência desta sonda, as diferenças observadas entre os dois lípidos são mínimas, apresentado um valor em DOPC de 0,27 e em DPPC de 0,29 consistentes com os valores observados nos mesmos sistemas [96]. Neste estudo é avançado um processo de homotransferência como uma possibilidade para explicar a pequena diferença observada entre os valores de anisotropia. Neste processo, devido à proximidade das moléculas de sonda, há transferência de energia de excitação de um fluoróforo para outro por um processo não radiativo, alterando o plano de polarização da luz o que se vai traduzir numa diminuição da anisotropia de fluorescência da sonda. Num sistema em fase gel (DPPC) a compactação da membrana aumenta e o processo de homotransferência de energia torna-se mais eficiente, pelo que a emissão de fluorescência vem mais despolarizada do que o esperado, tendo em conta apenas o efeito da compactação [96]. Este processo torna a anisotropia de fluorescência do Di-4-ANEPPS um parâmetro pouco sensível a alterações biofísicas nas bicamadas lipídicas. Por último, os valores de tempo médio de vida aumentaram 0,4 ns em DPPC, exatamente o mesmo aumento reportado anteriormente [68].

Através do espectro de excitação do Di-4-ANEPPS, foi ainda calculado o valor de *R*. Este valor apesar de não ser um valor absoluto do potencial de dipolo da bicamada lipídica pode reportar mudanças neste. [65,68]. A Figura 34 mostra esse valor para os dois lípidos estudados, podendo concluir-se que a presença de DMSO em LUVs de DPPC provoca um aumento de 9 e

10 % nos tampões 1 e 2, respetivamente, enquanto em DOPC apenas leva a um aumento de 3 e 4%. Como  $R$  é um parâmetro “raciométrico” amplifica as variações que possam ocorrer no espectro de excitação, sendo por isso de esperar que não se detetem diferenças apreciáveis nos espectros, mas que se observem variações significativas no valor de  $R$ .

Olhando, agora, para os valores obtidos em DOPC e DPPC na ausência de DMSO (controlo) não se observam diferenças significativas e a presença de 5% DMSO provoca um aumento significativo do potencial de dipolo tanto em DOPC como em DPPC (Figura 34), isto mostra que o valor de  $R$  é insensível à microviscosidade do sistema, também já observado por outros autores [66]. Também é de notar que a presença de NaCl no tampão 2 não tem um efeito significativo no potencial de dipolo. Isto justifica-se com o facto de a presença de iões afetar sobretudo o potencial transmembranar quando existe um gradiente de concentração entre o meio aquoso interno e externo dos lipossomas, o que não é o caso nas experiências aqui descritas.



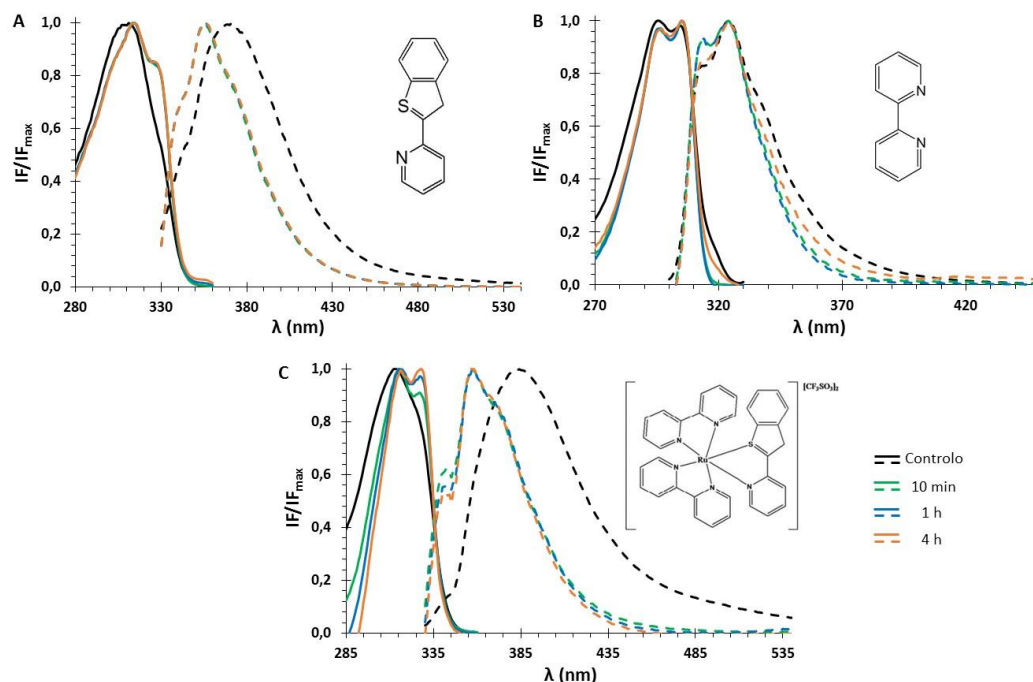
**Figura 34:** Efeito do DMSO no potencial de dipolo da membrana,  $R_{ex}$  – razão entre os valores de intensidade aos 420 e 520 nm do espectro de excitação do Di-4-ANEPPS com emissão a 635 nm, em LUVS de DOPC e DPPC nos tampões 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM). Controlo refere-se a amostras que não contêm DMSO.

### 5.3 Influência da bicamada lipídica no comportamento dos compostos

#### 5.3.1 Estudos da fluorescência intrínseca dos compostos na presença de bicamadas

Neste estudo utilizou-se a fluorescência intrínseca de alguns compostos, para avaliar se estes poderiam ou não estar a interagir com bicamadas de DOPC. Fez-se uma caracterização da fluorescência do composto em solução tamponada, que serviu de controlo, e na presença de LUVs de DOPC depois de 10 min, 1 h e 4 h de incubação do composto com os lipossomas. Na Figura 35 estão representados os espectros de excitação e emissão dos ligandos pbt (A) e bpy

(B) e do complexo de rutênio que tem esses ligandos coordenados ao seu centro metálico, OR6 (C).



**Figura 35:** Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) dos compostos da série I na ausência (controlo - preto) e na presença de LUVs de DOPC com diferentes tempos de incubação do composto (verde – 10 min; azul – 1 h; laranja – 4 h): **A** – Ligando pbt,  $C_{pbt} = 10 \mu\text{M}$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO; **B** - Ligando bpy,  $C_{bpy} = 10 \mu\text{M}$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO; **C** – Complexo OR6,  $C_{OR6} = 10 \mu\text{M}$ , tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4). Ao lado de cada gráfico encontra-se representada a estrutura do respetivo composto.

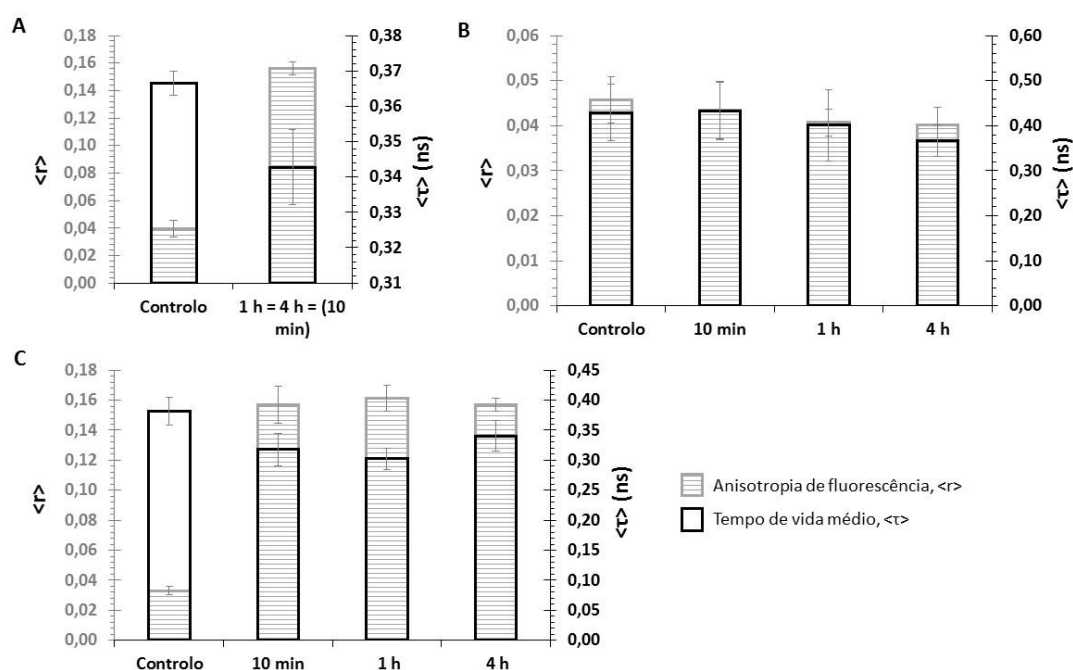
Observando a Figura 35 A e C um dos aspetos mais visíveis é que na presença de LUVs de DOPC se observam grandes desvios para o azul no máximo de emissão dos espectros do pbt e do OR6, respetivamente de 16 e 25 nm, sendo este desvio atingindo logo após 10 min de incubação do composto com as LUVs. Outro aspeto de fácil observação são as mudanças na progressão vibracional dos espectros de excitação e emissão na presença de DOPC. Nos espectros de excitação o desvio é bastante pequeno na presença de lípido, 2 nm para o vermelho em ambos os compostos, sendo que estes desvios devem estar relacionados com a mudança na progressão vibracional do espectro e não devido a um efeito de polaridade do solvente. Relativamente ao ligando bpy apenas se observam ligeiras mudanças na forma espectral tanto no espectro de excitação como de emissão, na presença de LUVs de DOPC (Figura 35 B).

O desaparecimento da estrutura vibracional, tanto em espectros de excitação como emissão, num ambiente mais polar (neste caso, ausência de LUVs) já foi observado noutros estudos [97], este aspeto irá merecer mais atenção na discussão dos resultados. Um desvio no espectro de emissão para o azul é consistente com a inserção do composto num ambiente menos polar. Esta é uma informação mais sensível na emissão uma vez que a excitação ocorre

em cerca de  $10^{-15}$  s, um tempo muito curto para a reorientação das moléculas de fluoróforo ou de solvente [69,71].

Apesar de não ser observável pelos espectros representados na Figura 35 (uma vez que estão normalizados para facilitar comparações da posição energética e progressão vibracional), ocorreu, também, uma diminuição do rendimento quântico na presença de lípido tanto no caso do ligando *bpy* como no do complexo OR6, enquanto o oposto se passou para o ligando *pbt*. Na determinação do valor de  $K_p$  dos compostos será explorada esta variação de rendimento quântico (secção 5.5).

A Figura 36 reúne a variação de anisotropia de fluorescência e o tempo médio de vida dos três compostos referidos, na ausência e presença de lípido.



**Figura 36:** Anisotropia de fluorescência em estado estacionário,  $\langle r \rangle$ , representada com barras cinzentas riscadas e tempo de vida médio de fluorescência,  $\langle \tau \rangle$ , representado com barras pretas, dos compostos da série I na ausência (controlo) e na presença de LUVs de DOPC com diferentes tempos de incubação com o composto: **A** – Ligando *pbt*,  $C_{pbt} = 10 \mu\text{M}$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO; **B** - Ligando *bpy*,  $C_{bpy} = 10 \mu\text{M}$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO; **C** – Complexo OR6,  $C_{OR6} = 10 \mu\text{M}$ , tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4).

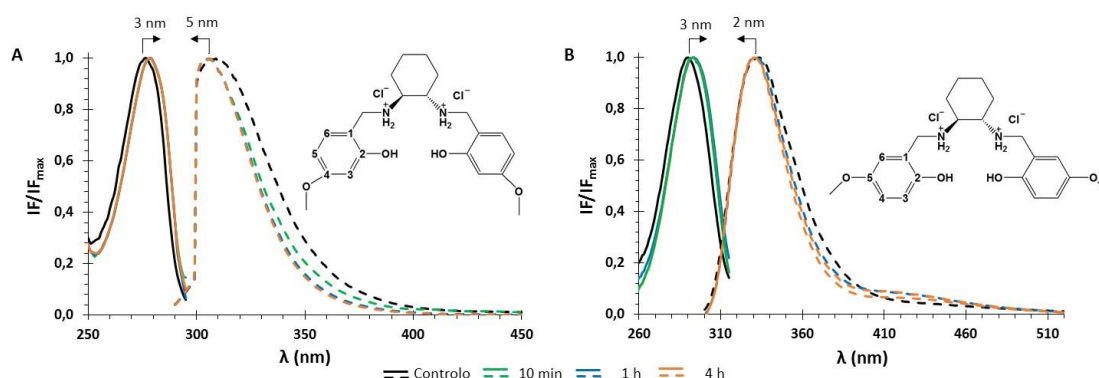
Para o ligando *pbt* (Figura 36 A) apenas se representam os resultados para 1 h de incubação do composto com as bicamadas uma vez que nos dois primeiros ensaios que se realizaram os valores obtidos para os vários tempos de incubação eram indistinguíveis. Na presença de LUVs de DOPC há um aumento de 75% no valor de anisotropia de fluorescência e uma diminuição de 7% no tempo de vida médio do *pbt*. Em relação aos mesmos parâmetros do ligando *bpy* (Figura 36 B) não se observam diferenças significativas na presença de lípido. No entanto, parece haver uma tendência para a sua diminuição para tempos de incubação mais longos. Finalmente e



analogamente ao que acontece com o ligando pbt, há um grande aumento do valor de anisotropia (79%) logo após 10 min, e uma diminuição de 17% no tempo de vida médio do OR6 na presença de LUVs de DOPC (Figura 36 C). Os valores de anisotropia apresentados para o ligando pbt e para o complexo OR6 rondam 0,15 que são bastante próximos do valor de anisotropia apresentado por um composto de ruténio  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$  (com dppz = dipirido[3,3-a:2',3'-c]-fenazino) utilizado como sonda membrana, cuja localização se sabe ser o interior da bicamada [95,98]. Embora existam diferenças no tempo de vida médio na presença de lípido para os diferentes tempos de incubação, estas não se consideram significativas uma vez que as variações são inferiores à resolução temporal do sistema de deteção (50 ps).

Deste estudo foi, ainda, possível concluir que as interações dos compostos são bastante rápidas, tendo-se atingindo logo após 10 min um equilíbrio de interação entre os compostos e as LUVs.

Na Figura 37 A estão representados os espectros de excitação e emissão do ligando Salan 4-MeO e na Figura 37 B do ligando Salan 5-MeO na presença e ausência de lípido. Estes são os ligandos dos complexos S8 e S10, respetivamente. Apesar de nos estudos iniciais de caracterização dos compostos se ter concluído que o complexo S10 apresenta fluorescência intrínseca, não foi possível fazer este estudo, uma vez que se observou que na presença de lípido o complexo perde a fluorescência. No entanto, por si só este resultado já sugere que o complexo S10 tem uma interação com a membrana.

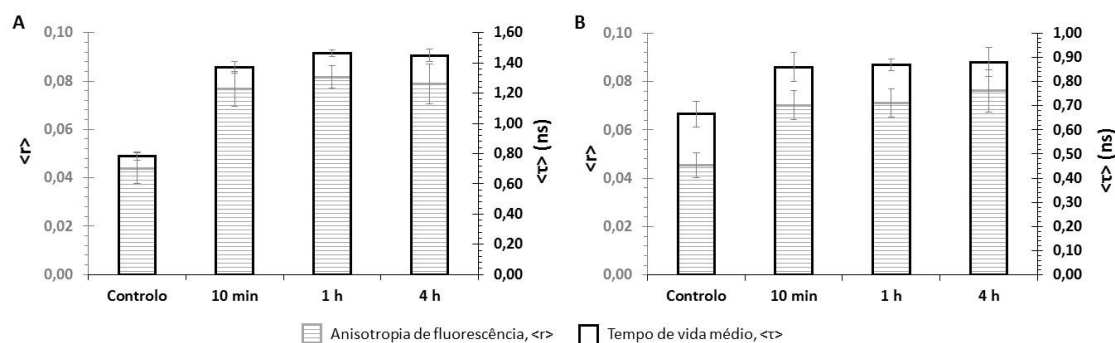


**Figura 37:** Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) dos ligandos Salan na ausência (controlo - preto) e na presença de LUVs de DOPC com diferentes tempos de incubação do composto (verde – 10 min; azul – 1 h; laranja – 4 h): **A** – Ligando Salan 4-MeO,  $C_{\text{Salan 4-MeO}} = 20 \mu\text{M}$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO; **B** - Ligando Salan 5-MeO,  $C_{\text{Salan 5-MeO}} = 15 \mu\text{M}$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO. Ao lado de cada gráfico encontra-se a imagem da estrutura do respetivo composto.

No que diz respeito à Figura 37, observa-se que para ambos os ligandos há pequenos desvios no máximo de excitação para o vermelho (3 nm) e no máximo de emissão de 5 nm do Salan 4-MeO e de 2 nm do Salan 5-MeO para o azul na presença das bicamadas de DOPC. Mais uma vez estes desvios são observados logo após 10 min de incubação dos compostos com as

LUVs, mantendo-se o mesmo desvio para os restantes tempos de incubação estudados. Em ambos os ligandos se observou um aumento da sua fluorescência intrínseca na presença de lípido (poderá visualizar-se melhor esse efeito na secção 5.5).

Na Figura 38 A estão representados a anisotropia e o tempo de vida médio do Salan 4-MeO em solução e após diferentes tempos de incubação com LUVs de DOPC. Observa-se que em ambos os parâmetros há um aumento na presença de lípido: de 46% na anisotropia (após 10 min) e de 47% no tempo de vida médio (após 1 h). Relativamente ao Salan 5-MeO, observa-se que logo após 10 min de incubação com a membrana se atingem os valores máximos. Especificamente, há um aumento de anisotropia de 37% ao fim de 10 min de incubação do ligando com as bicamadas de DOPC e um aumento de 23% no tempo de vida médio. O facto de o tempo de vida médio máximo apresentado pelo Salan 4-MeO só se atingir após 1 h de incubação com as LUVs, sugere que o equilíbrio de interação deste ligando seja mais lento que o do Salan 5-MeO.



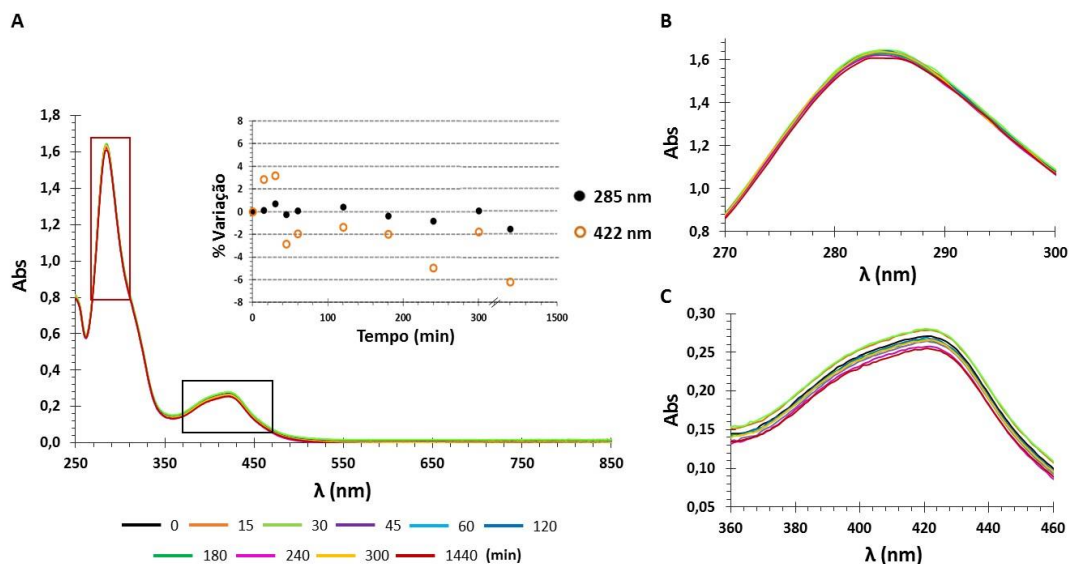
**Figura 38:** Anisotropia de fluorescência em estado estacionário,  $\langle r \rangle$ , representada com barras cinzentas riscadas e tempo de vida médio de fluorescência,  $\langle \tau \rangle$ , representado com barras pretas, dos ligandos Salan na ausência (controlo) e na presença LUVs de DOPC com diferentes tempos de incubação com o composto: **A** – Ligando Salan 4-MeO,  $C_{\text{Salan 4-MeO}} = 20 \mu\text{M}$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO; **B** - Ligando Salan 5-MeO,  $C_{\text{Salan 5-MeO}} = 15 \mu\text{M}$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO.

### 5.3.2 Estabilidade dos complexos de ruténio na presença de bicamadas lipídicas

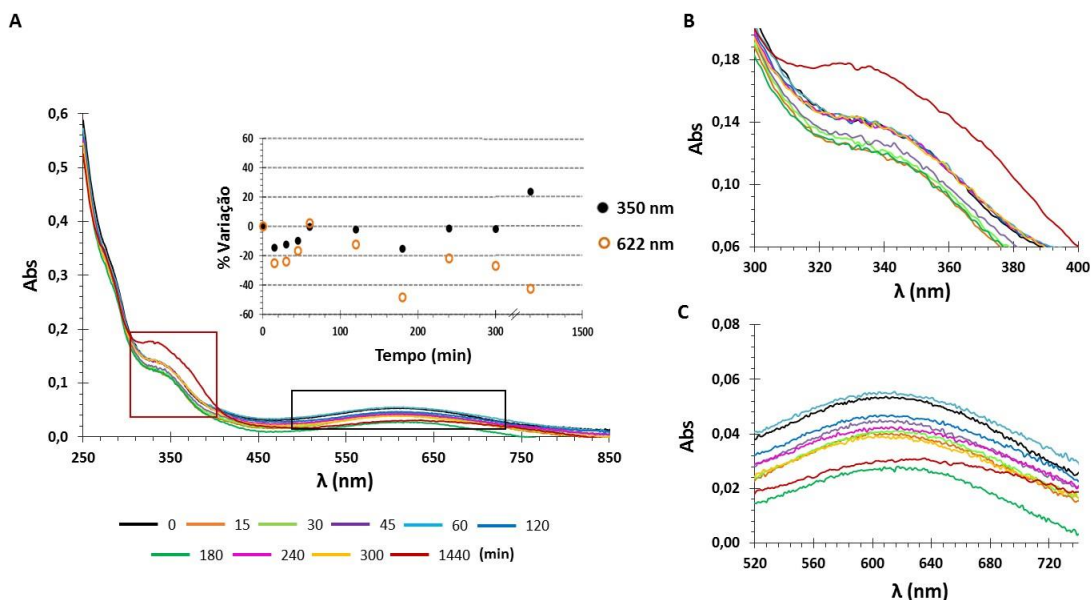
Inicialmente estudou-se a estabilidade dos compostos em solução, mas interessou, também, perceber se a estabilidade dos compostos era diferentemente afetada na presença de bicamadas de DOPC. Este estudo foi realizado para os três complexos OR6, S8 e S10.

Na Figura 39 estão representados os espectros de absorção UV-visível do complexo OR6 ao longo de 24 h, bem como a percentagem de variação a dois comprimentos de onda diferentes. Em estudos anteriores tinha-se concluído que este composto era bastante estável em solução [15] e o mesmo acontece na presença de lípido. A banda MLCT apresenta uma maior variação do que a banda intra-ligando, mas após 24 h apenas apresenta uma variação de cerca de 6%.

Também não se observaram desvios nos máximos do espectro: a banda MLCT tem um máximo a cerca de 422 nm e a intra-ligando a 285, tal como aconteceu na mesma solução tamponada mostrado por Santos, F. 2011 [15].

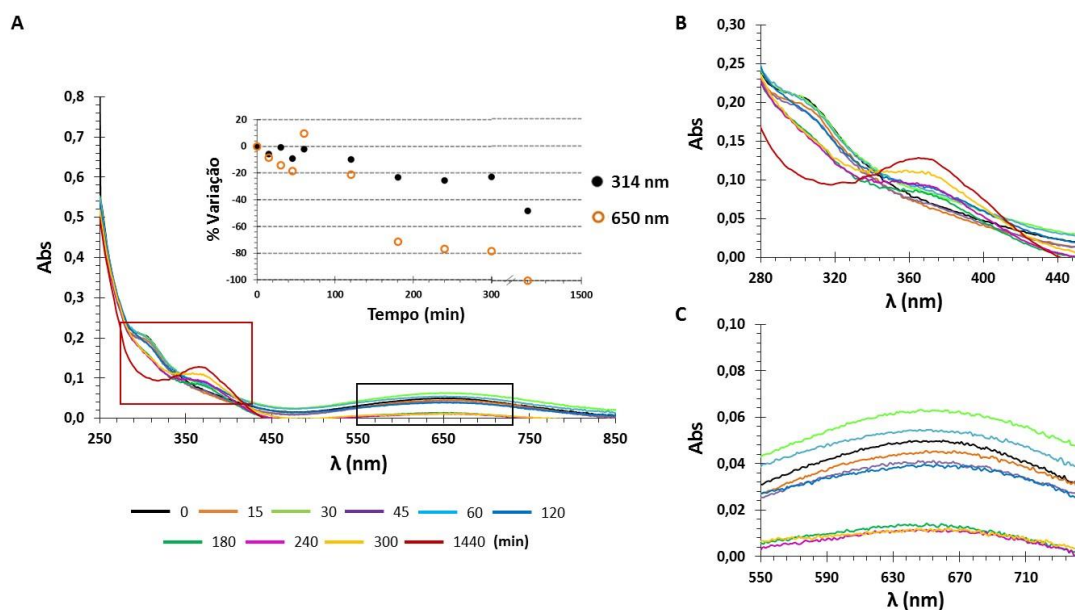


**Figura 39:** Estudo de estabilidade do complexo OR6,  $C_{OR6} = 60 \mu M$ , em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e na presença de LUVs de DOPC. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 285 nm (banda intra-ligando) e 422 nm (banda MLCT); **B** – Zoom da zona rodeada a vermelho no gráfico A (270 – 300 nm); **C** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (360 – 460 nm).



**Figura 40:** Estudo de estabilidade do complexo S8,  $C_{S8} = 25 \mu M$ , em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) com 2% DMSO e na presença de LUVs de DOPC. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 350 nm (banda intra-ligando  $PPh_3$ ) e 622 nm (banda LMCT); **B** – Zoom da zona rodeada a vermelho no gráfico A (300 – 400 nm); **C** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (520 – 740 nm).

As Figura 40 e Figura 41 mostram o estudo de estabilidade realizado na presença de LUVs de DOPC para os complexos S8 e S10, respetivamente. Tal como já se tinha observado em solução, há uma maior variação do complexo S10 relativamente ao complexo S8. Na presença de lípido ambos os complexos apresentam menor percentagem de variação nas primeiras horas, mas após 24 h apresentam variações de aproximadamente 40% (banda LMCT). No complexo S8, Figura 40, ao fim de 24 h, uma diferença bem visível, relativamente à química em solução (Figura 23) é o aumento de intensidade da banda intra-ligando, banda atribuída ao ligando  $\text{PPh}_3$ .



**Figura 41:** Estudo de estabilidade do complexo S10,  $C_{S10} = 27 \mu\text{M}$ , em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) com 2% DMSO e na presença de LUVs de DOPC. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 314 nm (banda intra-ligando  $\text{PPh}_3$ ) e 650 nm (banda LMCT); **B** – Zoom da zona rodeada a vermelho no gráfico A (280 – 450 nm); **C** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (550 – 740 nm).

Já nos espectros do complexo S10, Figura 41, vai-se observando ao longo do tempo a diminuição de intensidade da banda LMCT e o aparecimento de uma banda mais intensa por a cerca de 370 nm. As diferenças entre os espectros de absorção dos complexos em solução e na presença de lípido podem ser devidas à interação dos complexos com a bicamada lipídica.

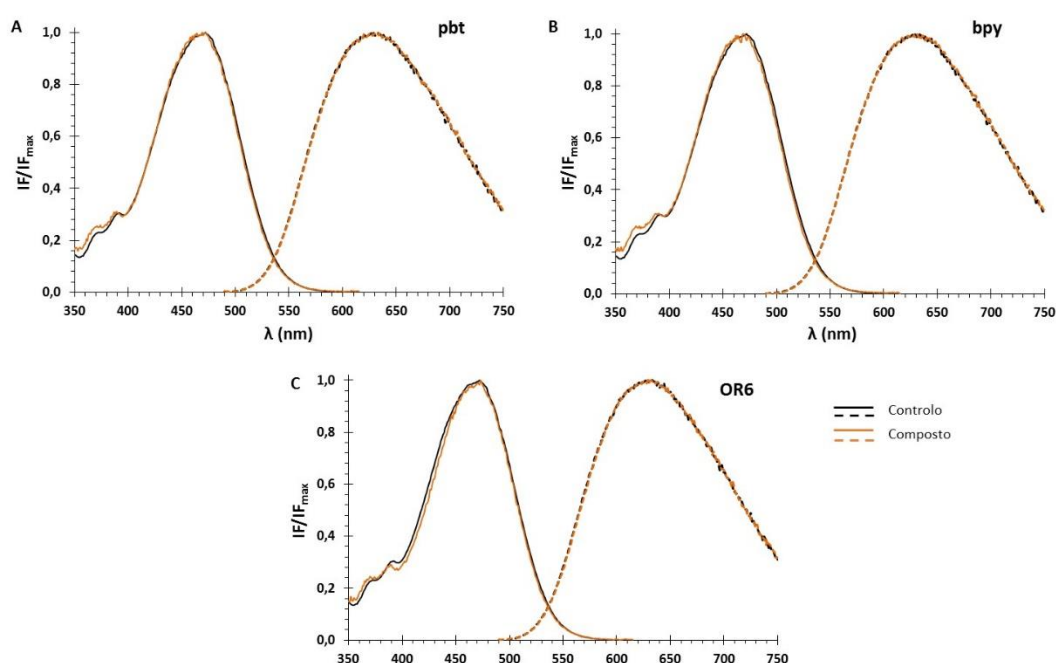
Outro complexo de ruténio já aqui referido,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ , também apresenta diferença nos espectros em solução tamponada com 10 mM Tris\_50 mM KCl e quando está na presença de LUVs de um lípido aniónico (DPPG) [95].

## 5.4 Efeito dos compostos nas propriedades biofísicas da membrana

### 5.4.1 Estudos com a sonda de membrana Di-4-ANEPPS

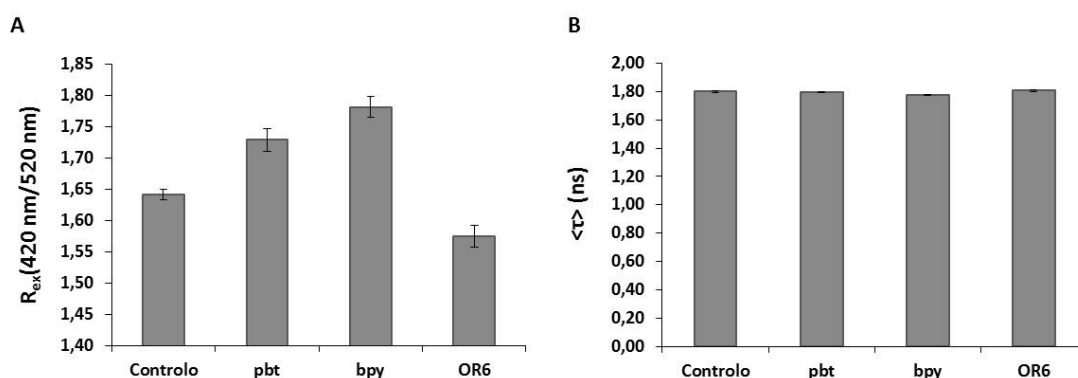
Para estudar a interação dos compostos não fluorescentes com bicamadas lipídicas usou-se uma sonda fluorescente. Neste estudo, utilizaram-se, também os compostos que apresentam fluorescência, para ser possível uma comparação entre todos os compostos. Posto isto, teve-se o cuidado de escolher uma sonda cujo espectro de absorção permitisse uma excitação seletiva em que se evitasse partilha de luz por parte dos compostos.

Neste estudo fizeram-se espectros de excitação e emissão da sonda em LUVs de DOPC na ausência (gráficos a preto) e presença de compostos (gráficos a laranja) e através dos espectros de excitação calculou-se o valor de  $R$ . Obtiveram-se também medidas de decaimento de intensidade de fluorescência da sonda, de modo a calcular-se o tempo de vida médio na ausência e presença de compostos. A anisotropia de fluorescência em estado estacionário não foi um parâmetro usado uma vez que, conforme já explicado, é pouco sensível a alterações na bicamada lipídica. As medidas efetuadas neste estudo foram recolhidas a um comprimento de onda ao qual os compostos não emitem e, portanto as variações nos parâmetros fotofísicos da sonda Di-4-ANEPPS refletem, apenas, alterações no microambiente desta sonda como consequência da interação dos compostos com a bicamada.



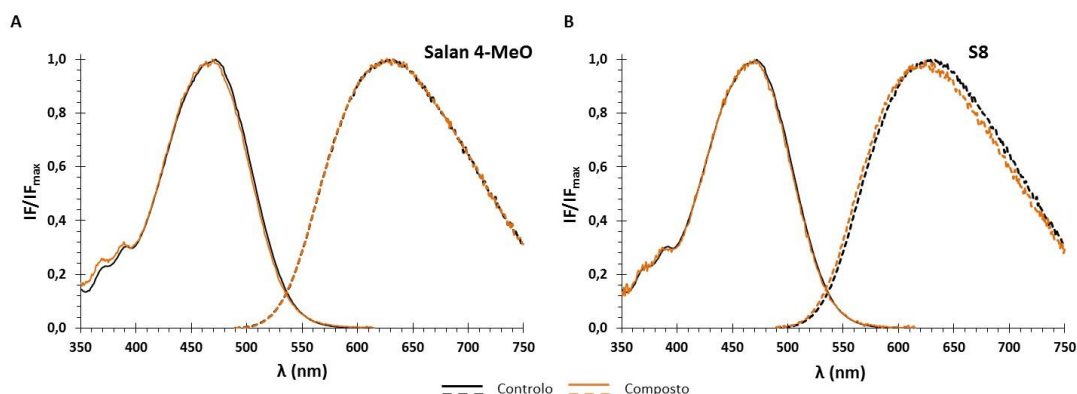
**Figura 42:** Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do Di-4-ANEPPS em LUVs de DOPC na ausência (controlo – preto) e na presença de compostos (laranja) depois de 1 h de incubação com as LUVs. **A** – Ligando *pbt*,  $C_{pbt} = 10 \mu\text{M}$ ; **B** – Ligando *bpy*,  $C_{bpy} = 20 \mu\text{M}$ ; **C** – Complexo OR6,  $C_{OR6} = 20 \mu\text{M}$ . O estudo foi realizado para todos os compostos em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e com 5% DMSO.

Na Figura 42 estão representados os espectros de excitação e emissão da sonda na ausência e presença dos compostos da série I. Conforme se pode ver, em todos os casos são apenas visíveis pequenas alterações ao nível do espectro de excitação. Os ligandos *pbt* (A) e *bpy* (B) provocam um desvio do espectro de excitação do Di-4-ANEPPS para o azul, enquanto o complexo OR6 provoca um desvio no sentido oposto. Esses desvios não são óbvios no máximo de excitação da sonda, mas sim na zona inicial do espectro. Uma vez que os espectros de excitação contêm informação sobre o potencial de dipolo [68], as diferenças referidas em cima são, também, observadas no valor de  $R$  (Figura 43 A), onde o efeito provocado pelos ligandos é contrário ao efeito provocado pelo complexo. A presença dos ligandos *pbt* e *bpy* provoca um aumento de 5% e 8%, respetivamente, no potencial de dipolo da membrana, enquanto o OR6 leva a uma diminuição de 4% neste parâmetro. No tempo de vida médio (Figura 43 B) as diferenças provocadas pelos compostos não são significativas, o maior efeito é observado na presença do ligando *bpy* e é apenas uma ligeira descida de 1%.

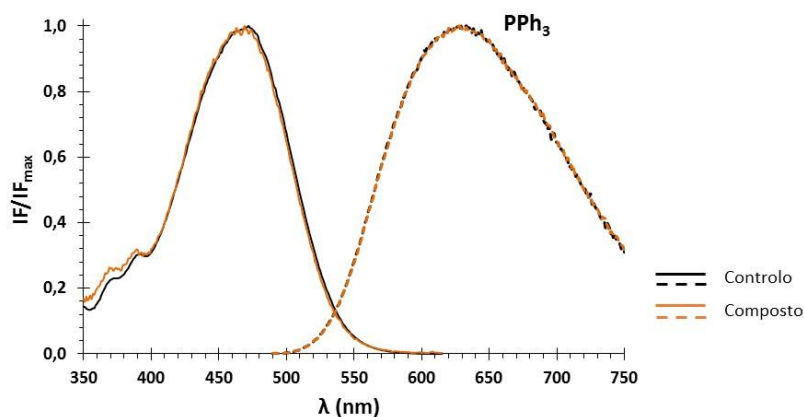


**Figura 43:** Efeito de compostos da série I no: **A** - Potencial de dipolo,  $R_{ex}$  – razão entre os valores de intensidade aos 420 e 520 nm do espectro de excitação do Di-4-ANEPPS com emissão a 635 nm; **B** – Tempo de vida médio,  $\langle \tau \rangle$ , do Di-4-ANEPPS. O estudo foi realizado para todos os compostos em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e com 5% DMSO.  $C_{pbt} = 10\text{ }\mu\text{M}$ ;  $C_{bpy} = 20\text{ }\mu\text{M}$ ;  $C_{OR6} = 20\text{ }\mu\text{M}$ ; Controlo refere-se a amostras de DOPC com Di-4-ANEPPS mas sem incubação com o composto.

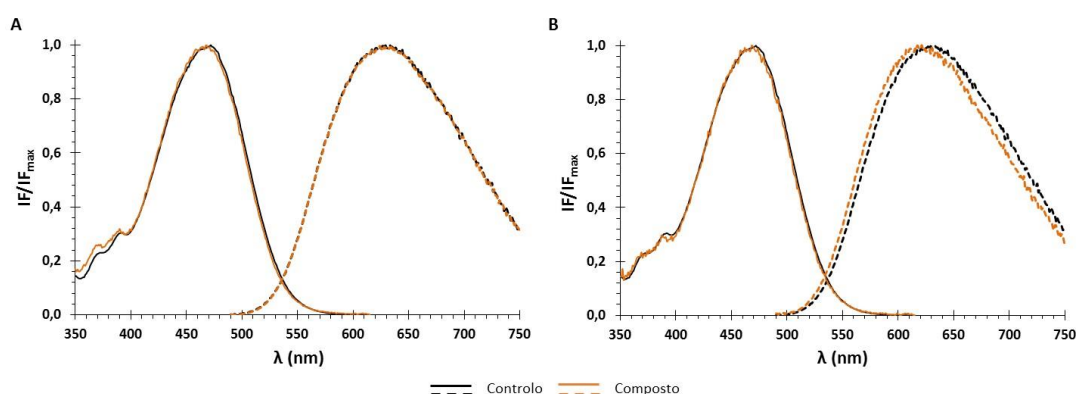
As Figura 44, Figura 45 e Figura 46 mostram os espectros de excitação e emissão do Di-4-ANEPPS na ausência e presença dos compostos da série II. De modo análogo ao que acontece na presença dos ligandos da série I, aqui a presença dos ligandos também provoca desvios para o azul no espectro de excitação do Di-4-ANEPPS, enquanto o espectro de emissão não apresenta diferenças (Figura 44 A Figura 45 e Figura 46 A). A presença dos complexos S8 e S10, por outro lado, provoca principalmente alterações no espectro de emissão da sonda. Na presença dos complexos S8 (Figura 44 B) e S10 (Figura 46 B) há desvios para o azul no máximo de emissão do Di-4-ANEPPS, um desvio de 9 nm na presença do S8 e de 12 nm na presença do S10.



**Figura 44:** Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do Di-4-ANEPPS em LUVs de DOPC na ausência (controle – preto) e na presença de composto (laranja) depois de 1 h de incubação com as LUVs. **A** – Ligando Salan 4-MeO,  $C_{\text{Salan 4-MeO}} = 20 \mu\text{M}$ ; **B** – Complexo S8,  $C_{\text{S8}} = 20 \mu\text{M}$ . O estudo foi realizado para os dois compostos em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e com 5% DMSO.



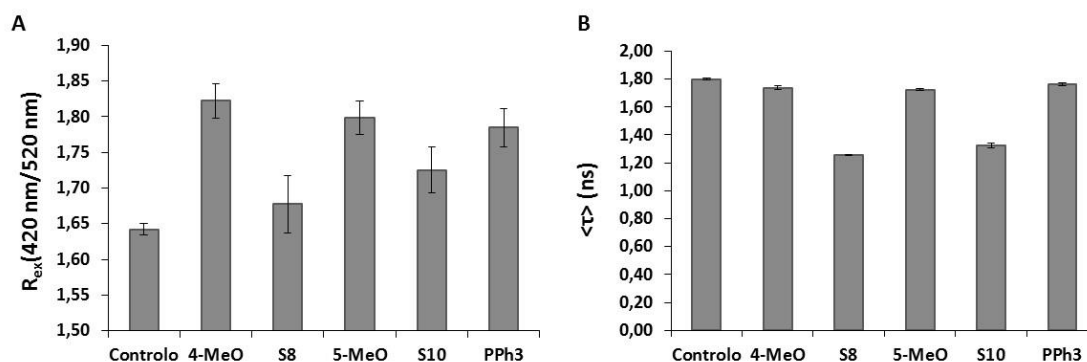
**Figura 45:** Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do Di-4-ANEPPS em LUVs de DOPC na ausência (controle – preto) e na presença do ligando  $\text{PPh}_3$ ,  $C_{\text{PPh}_3} = 10 \mu\text{M}$ , (laranja) depois de 1 h de incubação com as LUVs. O estudo foi realizado em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e com 5% DMSO.



**Figura 46:** Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do Di-4-ANEPPS em LUVs de DOPC na ausência (controle – preto) e na presença de composto (laranja) depois de 1 h de incubação com as LUVs. **A** – Ligando Salan 5-MeO,  $C_{\text{Salan 5-MeO}} = 20 \mu\text{M}$ ; **B** – Complexo S10,  $C_{\text{S10}} = 20 \mu\text{M}$ . O estudo foi realizado para os dois compostos em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e com 5% DMSO.

Também o potencial de dipolo sofre alterações na presença dos compostos da série II (Figura 49 A). Observa-se um maior efeito dos ligandos do que dos complexos, o que também já

era prenunciado pelos desvios nos espectros de excitação. O ligando Salan 4-MeO provoca um aumento de 10% no potencial de dipolo membranar enquanto o complexo S8 apenas aumenta este parâmetro em 3%. O complexo S10 e o seu ligando provocam um aumento de 6% e 9%, respetivamente e o co-ligando  $\text{PPh}_3$  de 8%. Na Figura 49 são ainda apresentados os valores de tempo de vida médio ( $\tau$ ) na ausência (controlo) e na presença dos compostos. Aqui, ao contrário do que se passa com o potencial de dipolo, a presença dos complexos têm um maior efeito neste parâmetro relativamente aos ligandos. Os complexos S8 e S10 levam a diminuições de 30% e 26%, respetivamente, no tempo de vida médio do Di-4-ANEPPS, enquanto os ligandos levam apenas a uma pequena diminuição deste parâmetro biofísico: as diferenças provocadas pelos ligandos são de 2-3%, e, fazendo uma comparação entre ligandos não há uma diferença significativa entre eles.



**Figura 47:** Efeito de diferentes compostos no: **A** - Potencial de dipolo,  $R_{ex}$  – razão entre os valores de intensidade aos 420 e 520 nm do espectro de excitação do Di-4-ANEPPS com emissão a 635 nm; **B** – Tempo de vida médio,  $\langle \tau \rangle$ , do Di-4-ANEPPS. O estudo foi realizado para todos os compostos em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e com 5% DMSO.  $C_{\text{Salan 4-MeO}} = 20 \mu\text{M}$ ;  $C_{\text{S8}} = 20 \mu\text{M}$ ;  $C_{\text{Salan 5-MeO}} = 20 \mu\text{M}$ ;  $C_{\text{S10}} = 20 \mu\text{M}$ ;  $[\text{PPh}_3] = 10 \mu\text{M}$ . Controlo refere-se a amostras de DOPC com Di-4-ANEPPS mas sem incubação do composto.

Um estudo bastante recente (realizado do Laboratório de Biofísica Molecular e Neural) utilizou sondas de membrana, uma delas o Di-4-ANEPPS, para reportar efeitos na bicamada lipídica por ácidos gordos hidroxilados com propriedades anticancerígenas [99]. Nesse estudo observou-se uma diminuição do valor de  $R$  com a inserção dos ácidos gordos em bicamadas lipídicas numa fase líquido-desordenado (fase formada por DOPC à temperatura ambiente), bem como desvios para o vermelho observados no espectro de excitação [99]. Esses resultados são concordantes com o aqui observado, quando se observou um desvio para o vermelho tiveram-se valores de  $R$  mais baixos que o controlo (caso do OR6). Noutro estudo efetuado no mesmo laboratório, atribuiu-se um desvio para o azul no espectro de emissão (aqui observado nos complexos S8 e S10) a uma redução na hidratação da bicamada, e a uma reorientação da cabeça dos fosfolípidos [68].



### 5.4.2 Estudo da estabilidade de LUVs na presença dos compostos

O objetivo desta secção é perceber até que ponto a presença dos compostos estava a alterar (ou mesmo destruir) o modelo membranar usado. Para isso fizeram-se medidas de DLS, que permitem obter a distribuição de tamanhos, em termos de diâmetro hidrodinâmico, da população de LUVs, e de potencial zeta (carga superficial). Foram usadas LUVs de DOPC, DPPC e ainda uma mistura aniónica DMPC:DMPG (7:3). O DMPG é o lípido que confere carga à mistura, sendo o DMPC utilizado para estabilizar as bicamadas, uma vez a formação de LUVs estáveis apenas com DMPG é dificultada pela repulsão eletrostática entre os grupos polares carregados negativamente.

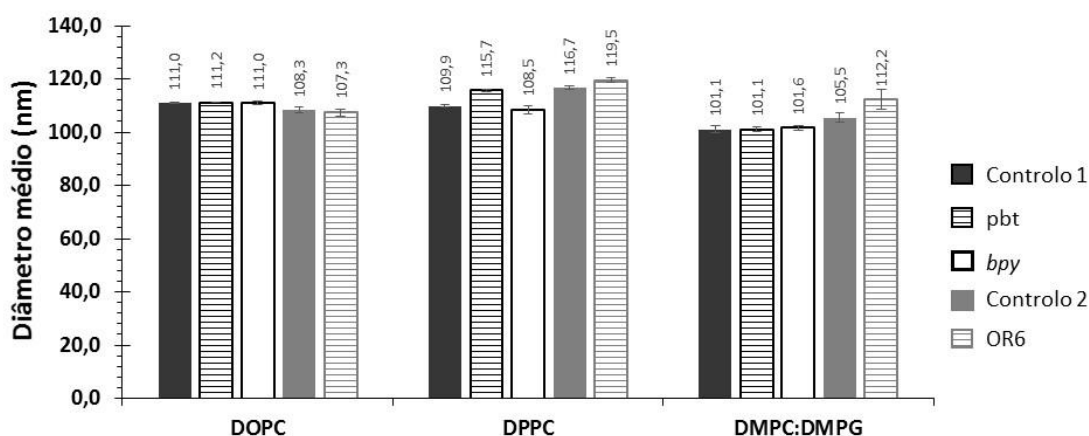
Nas Figura 48 e Figura 49 estão representados resultados os valores do diâmetro médio de LUVs com diferentes composições, para a série I e II de compostos, respetivamente. Os resultados foram obtidos na ausência (controlos – representados nos gráficos por barras a cheio pretas ou cinzentas) e na presença de compostos. Obtiveram-se valores entre 106 – 120 nm de diâmetro médio de LUVs, o que está de acordo com o tamanho esperado para LUVs formados pelo método de extrusão usando um filtro com diâmetro de poro de 100 nm [29].

Relativamente aos resultados obtidos em LUVs de DOPC observa-se que, quando comparados com os respetivos controlos, não há diferenças (dentro do erro experimental) nos tamanhos destas quer na presença dos compostos da série I (Figura 48) quer dos compostos da série II (Figura 49). No anexo 9.5 podem-se ver alguns exemplos de gráficos de distribuição de tamanhos. Para além do gráfico de distribuição de tamanhos, a partir das medidas de DLS obtém-se também um índice de polidispersão (PI) que varia entre 0, para um amostra inteiramente monodispersa, e 1 para uma suspensão polidispersa [53]. Para LUVs de DOPC o valor de PI foi sempre inferior a 0,097, indicando que a amostra é pouco polidispersa, ou seja a gama de distribuição de tamanhos encontrada é pequena.

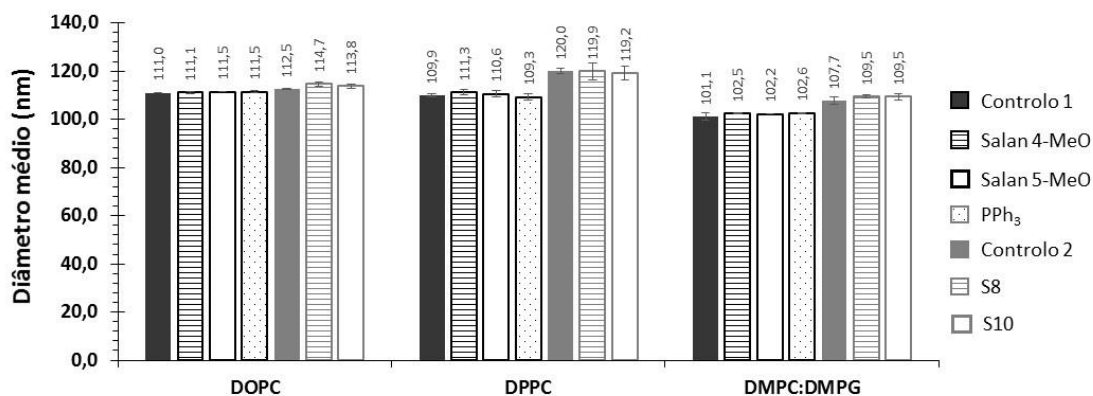
Os resultados em LUVs de DPPC são mais complexos de analisar uma vez que se observou uma maior polidispersão. Podem-se dividir os resultados em duas partes: aqueles com um valor de PI entre 0,110 e 0,190 e aqueles com valores de PI entre 0,490 e 0,728. Os primeiros foram obtidos para amostras em tampão 1 quer sem DMSO (complexo OR6 e respetivo controlo), quer com 2% DMSO (complexos S8 e S10 e respetivo controlo). Para LUVs com o complexo OR6 (Figura 48), observa-se um pequeno aumento do tamanho relativamente ao controlo. Para os complexos S8 e S10 (Figura 49) não se observam diferenças no tamanho das LUVs. Para LUVs de DPPC suspensas em tampão 2, que contém NaCl, observou-se que as amostras eram bastante mais polidispersas, visualizando-se duas populações independentes quer nos controlos (Figura A. 10), quer nas amostras que continham compostos (Figura A. 12). Nos resultados para o

tamanho de LUVs de DPPC em tampão 2, presentes nas Figura 48 e Figura 49, optou-se por colocar apenas os valores médios dos tamanhos referentes ao primeiro pico observado na distribuição de tamanhos, uma vez que será esse que diz respeito ao tamanho das LUVs. Nas LUVs de DPPC na presença de pbt observa-se um aumento do tamanho, o que não acontece na presença de *bpy* (Figura 48). Nas LUVs na presença de compostos da série II (Salan 4-MeO e 5MeO e PPh<sub>3</sub>) não se observam diferenças significativas no seu tamanho (Figura 49).

Finalmente, as LUVs de DMPC:DMPG são aniônicas, e como já foi referido, esta mistura foi usada com o objetivo de perceber se a presença de lípidos carregados afetava a interação dos compostos com a membrana e se, por sua vez esta se afetaria de forma diferente a estabilidade das LUVs. À semelhança do que aconteceu com LUVs de DOPC apenas se observou um pico na distribuição de tamanhos, e índices de polidispersão inferiores a 0,108. Nos compostos da série I (Figura 48) apenas se observou diferença na presença do complexo OR6, onde há um ligeiro aumento do tamanho das LUVs. Nos compostos da série II (Figura 49), dentro do erro experimental, não se observam diferenças.

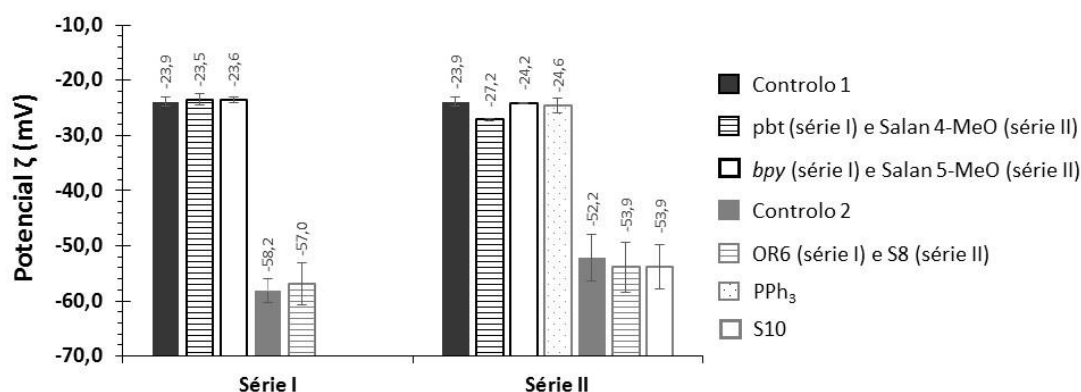


**Figura 48:** Valores médios do diâmetro de LUVs com diferentes constituições (DOPC, DPPC e DMPC:DMPG) na ausência (controles) e presença dos compostos da série I. As leituras foram realizadas depois de, aproximadamente, 1 h de incubação dos compostos com as LUVs. Para cada amostra foram feitas três medições (com cerca de 15 corridas cada uma) a 25 °C. Os valores representados são a média de pelo menos dois replicados. Controlo 1 refere-se a amostras sem composto em tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM) com 2% DMSO, sendo este o controlo das amostras que contêm os ligandos pbt,  $C_{\text{pbt}} = 10 \mu\text{M}$ , e *bpy*,  $C_{\text{bpy}} = 20 \mu\text{M}$ . Controlo 2 refere-se a amostras sem composto em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4), sendo este o controlo das amostras que contêm o complexo OR6,  $C_{\text{OR6}} = 20 \mu\text{M}$ .



**Figura 49:** Valores médios do diâmetro de LUVs com diferentes constituições (DOPC, DPPC e DMPC:DMPG) na ausência (controles) e presença dos compostos da série II. As leituras foram realizadas depois de, aproximadamente, 1 h de incubação dos compostos com as LUVs. Para cada amostra foram feitas três medições (com cerca de 15 corridas cada uma) a 25°C. Os valores representados são a média de pelo menos dois replicados. Controlo 1 refere-se a amostras sem composto em tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) com 2% DMSO, sendo este o controlo das amostras que contêm os ligandos Salan 4-MeO,  $C_{\text{Salan 4-MeO}} = 20 \mu\text{M}$ , Salan 5-MeO,  $C_{\text{Salan 5-MeO}} = 20 \mu\text{M}$  e PPH<sub>3</sub>,  $C_{\text{PPH}_3} = 10 \mu\text{M}$ . Controlo 2 refere-se a amostras sem composto em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) com 2% DMSO, sendo este o controlo das amostras que contêm os complexos S8,  $C_{\text{S8}} = 20 \mu\text{M}$ , e S10,  $C_{\text{S10}} = 20 \mu\text{M}$ .

A Figura 50 mostra os valores de potencial zeta obtidos para LUVs de DMPC:DMPG (para as LUVs de DOPC e DPPC o valor do potencial zeta foi zero) na ausência e presença dos compostos a série I e II.



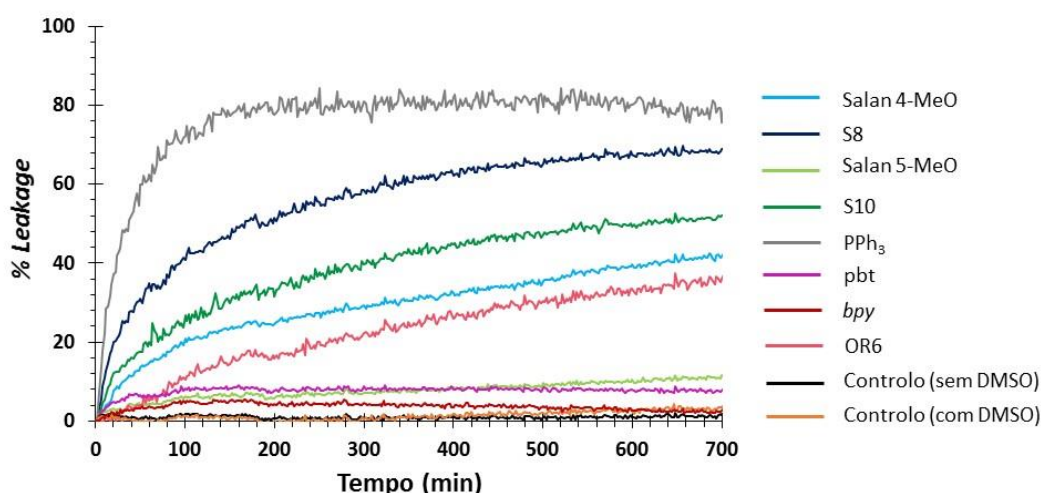
**Figura 50:** Potencial zeta ( $\zeta$ ) de LUVs de DMPC:DMPG (7:3 mol:mol) na ausência (controles) e presença dos compostos da série I e II. As leituras foram realizadas depois de, aproximadamente, 1 h de incubação dos compostos com as LUVs. Para cada amostra foi feita uma medição (entre 15 e 50 corridas consoante a amostra) a 25°C. Os valores representados são a média de pelo menos dois replicados. Controlo 1 refere-se a amostras sem composto em tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) com 2% DMSO, sendo este o controlo das amostras que contêm os ligandos pbt,  $C_{\text{pbt}} = 10 \mu\text{M}$ , e bpy  $C_{\text{bpy}} = 20 \mu\text{M}$  da série I e os ligandos Salan 4-MeO,  $C_{\text{Salan 4-MeO}} = 20 \mu\text{M}$ , Salan 5-MeO,  $C_{\text{Salan 5-MeO}} = 20 \mu\text{M}$  e PPH<sub>3</sub>,  $C_{\text{PPH}_3} = 10 \mu\text{M}$  da série II. Controlo 2 refere-se a amostras sem composto em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) sem DMSO na série I, sendo este o controlo das amostras que contêm o complexo OR6,  $C_{\text{OR6}} = 20 \mu\text{M}$  e com 2% DMSO na série II, sendo este o controlo das amostras que contêm os complexos S8,  $C_{\text{S8}} = 20 \mu\text{M}$ , e S10,  $C_{\text{S10}} = 20 \mu\text{M}$ .

Observa-se que LUVs suspensas em tampão 1 têm um valor de potencial zeta mais negativo, que no tampão 2, devido ao efeito de blindagem da carga do lípido por parte do NaCl. Apenas

se observa uma diferença, de 3 mV, no potencial zeta de LUVs na presença do ligando Salan 4-MeO (série II de compostos).

### 5.4.3 Efeito dos compostos na permeabilidade da membrana

Para explorar o efeito dos compostos na permeabilidade da bicamadas de DOPC, fez-se um estudo da libertação (*leakage*) de uma sonda, (5,6)-carboxifluoresceína (CF), previamente encapsulada nas LUVs. A Figura 51 mostra os resultados de *leakage* obtidos na presença de cada composto. Os valores de *leakage* máximo ( $L_{\max}$ ) e do tempo médio de *leakage*,  $\langle t_L \rangle$ , estão representados na Tabela 8 e foram obtidos conforme já explicado na secção 4.13.



**Figura 51:** Efeito dos diferentes compostos na permeabilidade da membrana, medida através da libertação (*leakage*) da sonda (5,6)-carboxifluoresceína de LUVs de DOPC. O ensaio foi realizado para todos os compostos em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) e com 2% de DMSO (à exceção do complexo OR6). Todos os compostos estão na concentração de 10  $\mu$ M. Controlo sem DMSO refere-se à amostra sem composto e sem DMSO – controlo do complexo OR6; Controlo com DMSO refere-se à amostra sem composto e com 2% DMSO – controlo dos restantes compostos.

Sabe-se que LUVs compostas por fosfolípidos insaturados (como o caso do DOPC) têm uma maior permeabilidade e por isso apresentam uma maior variação na intensidade de fluorescência basal e uma maior percentagem de libertação de sondas ao longo do tempo, relativamente a LUVs compostas por fosfolípidos saturados, mesmo que apenas suspensas em tampão [86]. Os controlos (laranja e preto) permitiram concluir que não há libertação significativa de sonda ao longo do tempo e, também, que o DMSO (controlo laranja) não tem efeito significativo na permeabilidade da membrana (Figura 51). Os resultados da percentagem de *leakage* ao longo do tempo, (Figura 51), permitiram concluir que o ligando *bpy* praticamente não altera a permeabilidade da membrana e os ligandos pbt e Salan 5-MeO têm um efeito pequeno. Os restantes compostos têm um efeito mais notório na permeabilidade da membrana.

Na Tabela 8, são apresentados os valores de *leakage* máximo ( $L_{\max}$ ) e do tempo médio de *leakage*,  $\langle t_L \rangle$ , apenas para os compostos que tiveram um efeito na permeabilidade da membrana, uma vez que para os outros não foi possível efetuar um ajuste de qualidade da Equação 14 às curvas experimentais.

**Tabela 8:** Parâmetros de permeabilidade da membrana (% *leakage* e tempo médio de *leakage*,  $\langle t_L \rangle$ ) obtidos para cada composto após ajuste aos resultados de experimentais usando a Equação 14.

Composto	<i>Leakage</i> (% max)	$\langle t_L \rangle$ (min)
<b>Salan 4-MeO</b>	$26 \pm 1$	$356 \pm 10$
<b>S8</b>	$65 \pm 4$	$161 \pm 11$
<b>Salan 5-MeO</b>	$15 \pm 2$	$160 \pm 9$
<b>S10</b>	$70 \pm 6$	$264 \pm 8$
<b>PPh3</b>	$80 \pm 1$	$35 \pm 2$
<b>OR6</b>	$90 \pm 2$	$1379 \pm 21$

Os resultados permitem concluir que o complexo OR6 é o composto capaz de produzir um maior aumento na permeabilidade da membrana (90%), embora seja aquele que demora mais tempo a fazê-lo, quase 24 h. Em contraste os resultados obtidos para os seus ligandos, pbt e *bpy*, indicam que estes não têm efeito na permeabilidade na membrana.

Em relação aos compostos da série II, observa-se que o PPh<sub>3</sub> é o composto com maior e mais rápido efeito de *leakage*. Os ligandos Salan têm um efeito menor, tendo o Salan 4-MeO uma consequência maior, mas mais lenta, na permeabilidade do que o Salan 5-MeO. Os complexos S8 e S10 (*leakage* máximo de 65-70%) têm um efeito semelhante na permeabilidade das bicamadas. No entanto o aumento da permeabilidade causada pelo complexo S10 é cerca de duas vezes mais demorado que o aumento provocado pelo complexo S8.

## 5.5 Coeficiente de partição membrana/água dos compostos

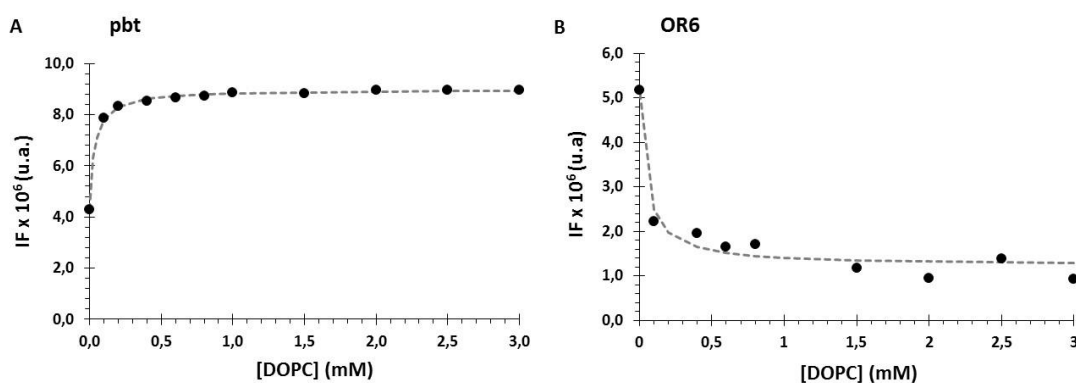
O coeficiente de partição ( $K_p$ ) membrana/água dos compostos foi determinado de dois modos diferentes: i) recorrendo à fluorescência intrínseca dos compostos; ii) através da fluorescência do Di-4-ANEPPS (ver secção 4.14 em Materiais e Métodos).

De entre os compostos que apresentam fluorescência intrínseca, não foi possível calcular-se através desta o  $K_p$  do ligando *bpy* e do complexo S10. A grande diminuição de fluorescência que estes exibem na presença de lípido não permitiu um ajuste razoável da Equação 18 aos dados. Por outro lado, embora o complexo OR6 também apresentasse uma diminuição da sua fluorescência na presença de lípido, para este foi possível um ajuste através da referida equação.

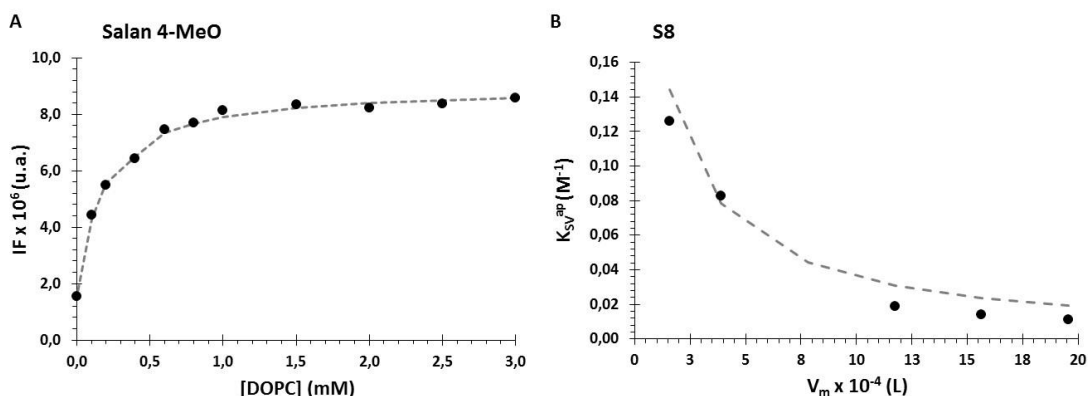
Depois de realizado o estudo do efeito dos compostos na bicamada lipídica através da sonda Di-4-ANEPPS, observou-se que os complexos S8 e S10 provocavam um decréscimo da

intensidade de fluorescência desta sonda (*quenching*). Assim, pensou-se em utilizar esta diminuição para determinar o valor de  $K_p$  dos complexos S8 e S10 (em anexo, Figura A. 15, estão apresentados dois gráficos que mostram a diminuição da fluorescência da sonda Di-4-ANEPPS na presença de concentrações crescentes destes complexos). Tentou-se ainda, através deste método, determinar o  $K_p$  dos ligandos *bpy* e  $PPh_3$ , mas estes, na gama de concentrações possíveis de utilizar, não alteraram suficientemente a intensidade de fluorescência do Di-4-ANEPPS para se conseguir determinar com confiança um valor de  $K_p$ .

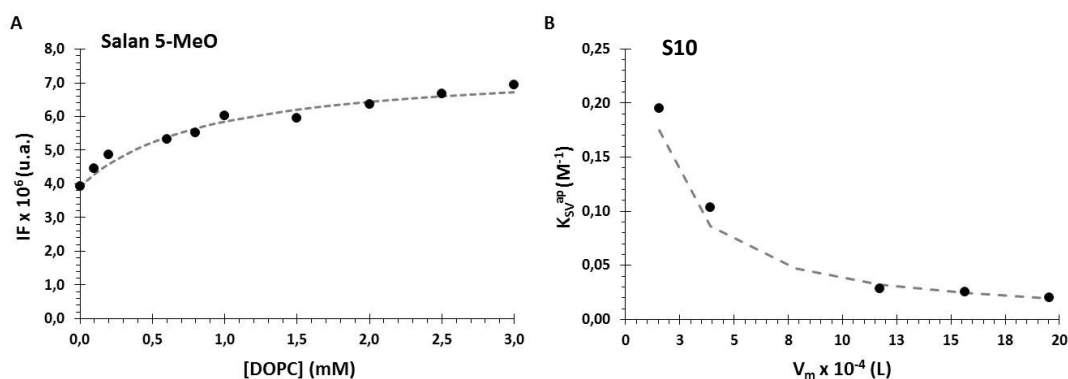
A Figura 52, Figura 53 e Figura 54 representam, respetivamente, os resultados obtidos para o ligando pbt e para o complexo OR6, para o ligando Salan 4-MeO e para o complexo S8 e para o ligando Salan 5-MeO e complexo S10.



**Figura 52:** Intensidade de fluorescência, IF, em LUVs de DOPC com diferentes concentrações de lípido do: **A** – Ligando pbt,  $C_{pbt} = 10 \mu M$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO,  $\lambda_{ex} = 312$  nm e  $\lambda_{em} = 372$  nm; **B** – Complexo OR6,  $C_{OR6} = 10 \mu M$ , tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4),  $\lambda_{ex} = 310$  nm e  $\lambda_{em} = 380$  nm. A linha a tracejado representa o ajuste por regressão não linear da Equação 18 aos valores experimentais. No caso do pbt a curva apresentada é ilustrativa para os valores de apenas uma experiência, na Tabela 9 os valores de  $K_p$  são a média de várias experiências.



**Figura 53:** **A** – Intensidade de fluorescência, IF, em LUVs de DOPC com diferentes concentrações de lípido, do Ligando Salan 4-MeO,  $C_{Salan\ 4-MeO} = 20 \mu M$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO,  $\lambda_{ex} = 277$  nm e  $\lambda_{em} = 304$  nm. A linha a tracejado representa o ajuste por regressão não linear aos valores obtidos, através da Equação 18; **B** – Constante de Stern-Volmer aparente do complexo S8, tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) 2% DMSO, em função do volume da fase lipídica em LUVs de DOPC. A linha a tracejado representa o ajuste por regressão não linear da Equação 23 aos valores experimentais. No caso do Salan 4-MeO a curva apresentada é ilustrativa para os valores de apenas uma experiência, na Tabela 9 os valores de  $K_p$  são a média de várias experiências.



**Figura 54:** **A** – Intensidade de fluorescência, IF, em LUVs de DOPC com diferentes concentrações de lípido, do Ligando Salan 5-MeO,  $C_{\text{Salan 5-MeO}} = 10 \mu\text{M}$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO,  $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ , a linha a tracejado representa o ajuste por regressão não linear aos valores obtidos, através da Equação 18; **B** – Constante de *Stern-Volmer* aparente do complexo S10, tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) 2% DMSO, em função do volume da fase lipídica em LUVs de DOPC. A linha a tracejado representa o ajuste por regressão não linear da Equação 23 aos valores experimentais. No caso do Salan 5-MeO a curva apresentada é ilustrativa para os valores de apenas uma experiência, na Tabela 9 os valores de  $K_p$  são a média de várias experiências.

Na Tabela 9 estão apresentados os valores de  $K_p$  obtidos para cada composto. O ligando pbt e o complexo OR6 apresentam um  $K_p$  semelhante e da mesma ordem de grandeza apresentada para sondas de membrana como o DPH ( $1,3 \times 10^6$ ) e *t*-PnA ( $1-5 \times 10^6$ ) [58,63]. O ligando Salan 5-MeO e o complexo S10 apresentam valores de  $K_p$  na ordem dos  $10^4$ , a mesma ordem de grandeza apresentada para o  $K_p$  do Di-4-ANEPPS [68]. Já o ligando 4-MeO apresenta um  $K_p$  superior ao desta sonda e o S8 ligeiramente inferior.

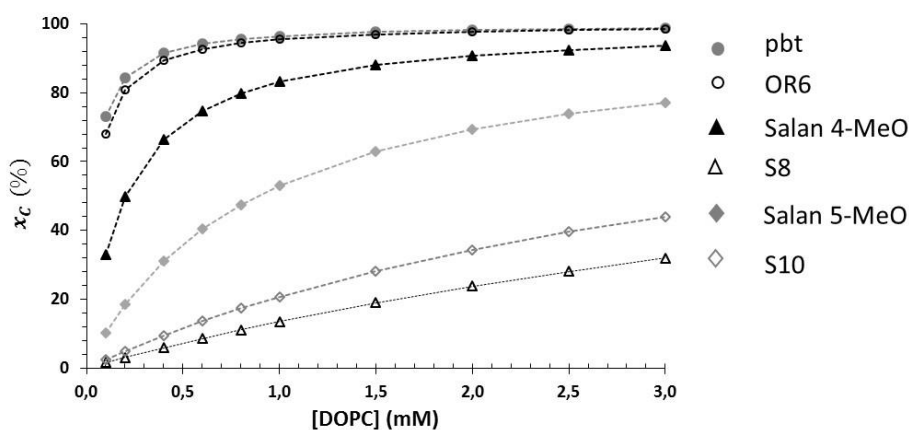
**Tabela 9:** Coeficiente de partição ( $K_p$ ) dos complexos de rutênio e dos seus ligandos em bicamadas de DOPC, calculados pelo ajuste da Equação 18 (pbt, OR6 e ligandos Salan) ou Equação 23 (S8 e S10) aos dados experimentais. Os erros assinalados com \* referem-se ao erro do ajuste, uma vez que nestes casos se fez a média dos valores experimentais e só depois se ajustaram as respetivas equações. Nos noutros casos os erros apresentados correspondem ao desvio padrão dos valores obtidos do ajuste separadamente da Equação 18 aos resultados de três experiências independentes.

Composto	$K_p \times 10^4$
pbt	$144 \pm 9$
OR6	$113 \pm 48^*$
Salan 4-MeO	$26,2 \pm 1,6$
S8	$0,8 \pm 0,5^*$
Salan 5-MeO	$5,97 \pm 0,08$
S10	$1,4 \pm 0,5^*$

Os valores de  $K_p$  permitem avaliar a e perceber a “preferência” dos compostos entre membrana e água, e estes resultados indicam que todos os compostos têm valores de  $K_p$  comparáveis aos de sondas membranares e que têm uma maior preferência pela membrana relativamente à água. É importante notar que cada complexo apresenta um valor de  $K_p$  inferior ao do seu ligando livre, sendo isso particularmente evidente no caso dos complexos S8 e S10 (e

os ligandos Salan 4-MeO e 5-MeO, respectivamente). Para o complexo S8 observa-se a maior variação:  $K_p(S8)$  é cerca de 3% do valor obtido para o  $K_p(\text{Salan 4-MeO})$ .

A Figura 55 permite fazer uma correlação entre todos os compostos em termos de percentagem de composto presente na bicamada de DOPC, calculado através da Equação 19. Pode parecer curioso que o ligando Salan 4-MeO apresente um  $K_p$  bastante superior ao Salan 5-MeO e que depois nos respetivos complexos aconteça o oposto. No entanto esta diferença pode ser justificada pela coordenação dos ligandos ao centro metálico, havendo outro ligando ( $\text{PPh}_3$ ) com influência na incorporação na membrana. Esta informação sugere que o grupo MeO pode ter alguma influência na interação com a membrana, e se assim for, é de esperar que o complexo S8 apresente um  $K_p$  ligeiramente inferior ao do S10, uma vez que esse grupo está numa posição estereoquimicamente mais impedida porque está mais próximo dos co ligandos  $\text{PPh}_3$  e do Cloro (Figura 6 A).



**Figura 55:** Percentagem de cada composto,  $X_c$ , que partilha para a fase membrana (LUVs de DOPC) em função da concentração de lípido. A linha a tracejado serve apenas para facilitar a leitura.



## 6 DISCUSSÃO

Esta tese dividiu-se em três etapas essenciais: Uma primeira etapa que teve como objetivo a otimização das condições experimentais para o estudo dos compostos com as bicamadas. Aqui, estudou-se a reatividade e fluorescência dos compostos em solução e avaliou-se o efeito do co-solvente DMSO nas propriedades biofísicas da membrana. A segunda fase teve como objetivo entender o efeito das bicamadas lipídicas nas propriedades fluorescentes e, através destas, no microambiente e na estabilidade dos complexos de ruténio e dos seus ligandos. E uma terceira fase em que se estudou o efeito dos compostos em algumas propriedades biofísicas da membrana. A determinação do  $K_p$  foi uma etapa que permitiu uma melhor interpretação dos resultados, sendo por isso várias vezes referida ao longo da discussão.

Na secção 5.1. foi referida a insolubilidade de alguns compostos em solução aquosa e a necessidade de usar um co-solvente. Este facto é uma indicação de algum carácter hidrófobo dos compostos, sugerindo assim a possibilidade de interação com as bicamadas lipídicas. Para o complexo OR6, que não necessitou de DMSO, há compostos na literatura com um “centro” de  $[Ru(bpy)_2]^{2+}$  semelhantes a este que são usados como sonda de membrana, o que também sugere que este complexo tenha uma forte possibilidade de interagir com a membrana. Um desses compostos é o  $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ , que tem tal como o OR6 dois ligandos *bpy* e um ligando bidentado com coordenação ao ruténio através de dois N (azoto), enquanto no OR6 há um ligando pbt bidentado com coordenação ao centro metálico através de N,S (azoto, enxofre) [95]. Este complexo e a maioria dos complexos de ruténio com centro de  $[Ru(bpy)_2]^{2+}$  apresentam emissão fosforescente a partir de um estado tripleto MLCT [69,95]. No caso do complexo OR6, aqui estudado, não se seguiu a emissão de fosforescência a partir de um estado MLCT. Neste trabalho avaliou-se a fluorescência dos ligandos *bpy* e pbt e conseguiu-se perceber que se está a excitar o complexo OR6 através do seu ligando pbt, uma vez que o máximo de excitação do pbt se encontra a cerca de 310 nm. No caso presente, não houve qualquer resultado que indicasse uma emissão eficiente a partir do estado MLCT do OR6, nomeadamente, nas experiências em que se usou o di-4-ANEPPS como sonda de membrana. A banda de transferência de carga do complexo está bastante sobreposta à banda de absorção da sonda, e tendo em conta os comprimentos de onda de emissão típicos da fosforescência de complexos de ruténio di-imino num estado MLCT, também seria de esperar sobreposição das bandas de emissão. No entanto, em todas as medidas de fluorescência do di-4-ANEPPS na presença de OR6, o sinal do branco (amostra com OR6 mas sem di-4-ANEPPS) era extremamente baixo, eliminando a possibilidade de uma emissão eficiente do OR6 a partir do estado MLCT, ou pelo

menos um sinal suficientemente forte que o tornasse útil no estudo da interação do OR6 com bicamadas lipídicas.

Relativamente aos precursores  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$  e  $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}_2]$  viu-se que estes não apresentam fluorescência intrínseca. No que concerne ao primeiro complexo isso entra, aparentemente, em contradição com os dados da literatura, uma vez que um dos compostos cuja fluorescência se encontra bem estudada é o  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  e também os seus derivados que dão origem a complexos semelhantes ao  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$  [90]. No entanto, deve ser tido em conta que o estudo da fluorescência destes compostos foi realizado depois de 12 h de incubação, uma vez que interessava para possíveis estudos posteriores que o complexo estivesse numa fase de pouca variação das suas propriedades em solução. Ambos os precursores são instáveis em solução, possivelmente por substituição do ligando lábil cloro pela água. No caso do complexo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$  isso é confirmado por um desvio para o azul da banda MLCT (Figura A. 3 e Figura A. 4) [94]. Complexos com ligandos “aqua” frequentemente não apresentam fluorescência o que foi observado anteriormente para complexos do tipo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ . Nesse estudo avançam com a explicação que a banda de transferência de carga decai totalmente por processos não radiativos, possivelmente através de vibrações de acoplamento com o solvente através do ligando “aqua” [94], sendo este processo uma possível justificação para a não fluorescência dos dois precursores.

Tendo em atenção agora os complexos S8 e S10, foi curioso observar fluorescência para S10, embora com baixo rendimento quântico, e para o S8 não, uma vez que a única diferença é a posição de dois grupos metoxi ( $\text{OCH}_3$ ). Tendo em conta as propriedades emissivas dos seus ligandos, a fluorescência detetada para o complexo S10 é proveniente de uma transição intra-ligando Salan 5-MeO. Uma das razões para o complexo S10 ser menos (ou nada) fluorescente comparativamente ao seu ligando, deve-se a uma passagem do estado localmente excitado (LE) do ligando para o estado de transferência de carga (ICT). Nos complexos S8 e S10 o seu estado neste caso é LMCT (e não MLCT), o ligando vai transferir carga mais facilmente para o centro metálico, pois o estado LMCT é de energia inferior e assim não há emissão de fluorescência a partir do ligando excitado ou, há pouco eficiente. Comparando os espectros de emissão dos ligandos Salan 4-MeO e 5-MeO (Figura 37 A e B, respetivamente), verifica-se que no último a banda se prolonga para comprimentos de onda superiores, pelo que há uma pequena probabilidade de ocorrer emissão por transição intra-ligando de energia inferior à transição LMCT. Isto explica que ainda se observe alguma emissão por parte do S10.

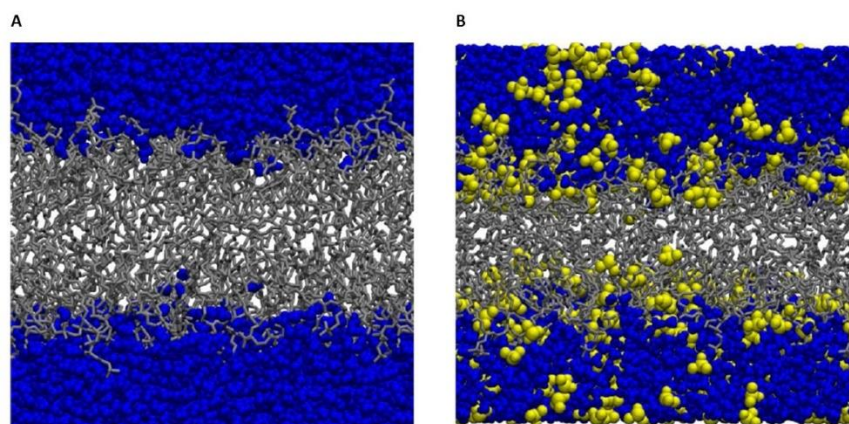
Outro ponto importante deste trabalho foi o estudo da influência do DMSO nas bicamadas, uma vez que este co-solvente foi necessário para a solubilização da maioria dos complexos. Na presença de DMSO um dos parâmetros afetados foi a anisotropia de fluorescência das várias

sondas. Um aumento neste parâmetro é sinónimo de menor rotação da molécula, neste caso da sonda fluorescente, o que acontece em ambientes mais ordenados/rígidos. Mudanças na anisotropia de fluorescência de sondas como o DPH e *t*-PnA refletem modificações no interior da membrana enquanto no Di-4-ANEPPS refletem alterações mais ao nível da interface membrana/água – mais próximo da zona da cabeça polar dos lípidos. Desta forma, os resultados nas LUVs de DOPC indicam que o DMSO está a provocar alterações na rigidez da membrana, sendo um efeito que se estende das cabeças polares do lípido até ao nível das cadeias acilo. Neste lípido o aumento do tempo de vida médio do DPH é consistente com o aumento de anisotropia. O facto do tempo de vida médio do Di-4-ANEPPS e do *t*-PnA não se alterarem pode ser sinónimo de que esta percentagem de DMSO tem um efeito pequeno na estrutura da bicamada.

Os resultados de anisotropia em LUVs de DPPC indicam também um aumento de rigidez da membrana. No entanto este é um efeito mais sentido no interior da membrana uma vez que não se observam diferenças nos parâmetros biofísicos da sonda Di-4-ANEPPS. O aumento da rigidez da membrana pode estar a ser provocado por uma desidratação da membrana, quer devido à substituição da camada de hidratação por moléculas de DMSO (DMSO estabelece ligações de hidrogénio com a água) quer devido à sua penetração na zona apolar da bicamada. O facto de o DMSO ser uma molécula com propriedades hidrófilas (grupo sulfóxido) e hidrófobas (grupos metilo), facilita a interação quer com as cabeças polares dos lípidos quer com as cadeias acilo [100,101]. Uma desidratação provocada pelo DMSO tem sido, também, descrita quer em estudos de simulação de dinâmica molecular quer experimentais, embora grande parte dos estudos sejam realizados com percentagens de DMSO bastante mais elevadas que as aqui utilizadas [101–104].

O tempo médio de vida do DPH e do *t*-PnA diminuíram na presença de DMSO em LUVs de DPPC, o que parece estar em discordância com os resultados obtidos de anisotropia de fluorescência, que indicam um aumento da rigidez da membrana. Este acontecimento pode ser provocado pela penetração de DMSO na bicamada lipídica, o que por um lado poderá levar a um menor empacotamento das cadeias acilo dos lípidos ou a uma alteração do ângulo de inclinação típico no empacotamento de bicamadas de DPPC em fase gel (secção 1.7.1). Um diferente empacotamento dos lípidos poderá levar a um decréscimo no tempo médio de vida do *t*-PnA e, por outro lado, provocará *quenching* da fluorescência do DPH. Sabe-se que a água é um *quencher* da fluorescência do DPH e sendo o DMSO polar, tal como a água, é plausível de provar *quenching* do DPH.

Na Figura 56, pode observar-se uma imagem obtida por simulação de dinâmica molecular de bicamada de DOPC na ausência (A) e presença de DMSO (B).



**Figura 56:** Simulação de dinâmica molecular de uma bicamada de DOPC a 350 K, com aproximadamente 46 molécula de solvente por molécula de lípido. As moléculas de fosfolípidos, água e DMSO estão representadas a cinzento, azul e amarelo por esta ordem. **A** – Simulação na ausência de DMSO; **B** – Simulação na presença de 10 mol % de DMSO ( $\approx 31\%$  (v/v)) (adaptado de [101]).

Embora a imagem seja obtida para uma percentagem de DMSO de aproximadamente de 30% (v/v), bastante mais elevada que os 5% usados neste trabalho, pode observar-se o que foi descrito atrás, uma substituição das moléculas de água por moléculas de DMSO e uma capacidade de penetração do DMSO na bicamada. Um efeito também bastante visível na imagem é a diminuição da espessura da bicamada [101]. Apesar de através do estudo realizado neste trabalho não se poderem tirar conclusões diretas acerca desse efeito, uma diminuição da ordem das cadeias acilo está, geralmente, relacionada com uma diminuição da espessura da bicamada por aumento do número de conformações *gauche*. No entanto em estudos de difração de raios-X os resultados são um pouco diferentes, e chega-se à conclusão que não há uma diminuição da espessura da bicamada mas sim da distância de repetição entre bicamadas num sistema multilamelar, consequência da diminuição da camada de hidratação [103,105]. E este é um resultado que corrobora as conclusões aqui tiradas em que se observa uma diminuição da hidratação.

Foi, ainda, determinada a influência do DMSO ao nível do potencial de dipolo da membrana, através do cálculo do valor de  $R$ . Um aumento neste valor pode ser devido às propriedades do DMSO (como o momento dipolar), mas também devido à sua influência nas propriedades biofísicas da membrana. Sabe-se que as moléculas de água têm um grande contributo para o potencial de dipolo e já foi reportado que um aumento da hidratação da membrana provoca uma diminuição no potencial de dipolo [99]. Já foi mencionado anteriormente que o DMSO poderia estar a substituir algumas águas de hidratação da membrana, diminuindo por isso a sua hidratação, o que pode justificar o aumento do potencial de dipolo. Por outro lado, também se sabe que alterações no empacotamento das cadeias acilo dos lípidos podem provocar alterações no potencial de dipolo, o que pode também estar a ser

provocado pelo DMSO [106]. Sendo o DOPC um lípido na fase fluida à temperatura ambiente, tem maior permeabilidade a pequenas moléculas. Isto pode justificar o maior aumento do valor de  $R$  na presença de DMSO em LUVs de DPPC: uma penetração de DMSO em LUVs de DOPC não provocará um efeito tão drástico como no DPPC, que apresenta uma fase gel à temperatura ambiente, e apresenta uma difusão de solutos muito menor. Por outro lado, pode ser um efeito da orientação do DMSO. No DOPC este deverá ter uma orientação mais aleatória, não provocando tantas alterações ao nível do potencial de dipolo, e no DPPC uma orientação mais definida, sendo forçado a estabelecer interações de maior direccionalidade e, consequentemente aumentando a rigidez da membrana (como já mencionado em cima).

Um maior efeito no potencial de dipolo (aumento) de lípidos saturados (DPPC) também já foi observado para o colesterol. Isso pode ser devido ao facto do colesterol também poder substituir algumas moléculas de água sem diminuir drasticamente a ordem das cadeias acilo, devido à estrutura rígida dos seus quatro anéis [107], o que também poderá acontecer, embora em menor extensão, com o DMSO.

Este estudo permitiu concluir que a percentagem de DMSO usada altera certas propriedades biofísicas da membrana, como hidratação e empacotamento. Apesar disso, para as percentagens usadas nesta tese os efeitos não são drásticos, não havendo alterações nos parâmetros biofísicos das sondas utilizadas superiores a 13%. A bicamada em fase gel continua a ter características típicas desta fase e, o mesmo se pode afirmar relativamente à bicamada em fase fluida. No entanto, para ter em conta qualquer efeito provocado pelo DMSO nas bicamadas lipídicas, teve-se o cuidado de utilizar sempre um controlo com as mesmas percentagens deste co-solvente no estudo da interação dos compostos com bicamadas de DOPC.

Outro objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da presença de lípido nas propriedades fluorescentes e na estabilidade dos complexos. Na secção 5.3. descreveram-se as alterações nos parâmetros de fluorescência dos compostos na presença de lípido. Começando pelos compostos da série I, pode-se dizer que o ligando *bpy* apresenta um comportamento na presença de lípido semelhante ao que apresenta em solução aquosa, sendo o efeito mais significativo a diminuição da sua fluorescência intrínseca que, é de tal forma acentuado que não foi possível o ajuste da Equação 18 para determinar o valor de  $K_p$ . Esta diminuição de rendimento quântico, quando se passa de um solvente prótico (água) para um solvente menos polar, indica que no primeiro a transição será do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , enquanto no segundo será do tipo  $n \rightarrow \pi^*$ . De facto, sabe-se que a transição de energia mais da piridina em solventes apolares é a  $n \rightarrow \pi^*$  e, portanto de rendimento quântico bastante baixo. Em solventes próticos, o estabelecimento de ligações de H com o heteroátomo N (que estabiliza os eletrões não ligantes deste), torna a orbital  $\pi$ , do sistema aromático, a orbital preenchida de energia mais elevada (HOMO). Assim, neste caso, a transição

eletrónica será do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  e, logo de rendimento quântico muito superior [71]. As pequenas alterações observadas no espectro de excitação e de emissão do *bpy* justificam-se devido à existência de sempre alguma fração de moléculas que estão em solução, mesmo na presença de lípido, e a emissão ser dominada por essa população de moléculas. O facto de haver um decréscimo da fluorescência pode ser devido a um aumento na constante de decaimento não radiativo ( $k_{nr}$ ) na presença de um ambiente menos polar (presença de LUVs). O facto de haver uma diminuição na intensidade de fluorescência mostra que está a haver uma interação com as bicamadas.

Em contraste há grandes alterações na fluorescência do ligando pbt e no complexo OR6. Os resultados mais evidentes de interação com as bicamadas lipídicas são o grande aumento de anisotropia, mostrando que a emissão dos compostos é menos despolarizada e portanto estão na presença de um ambiente com movimento mais restrito, e o desvio para o azul no espectro de emissão, indicando que os compostos estão num ambiente mais hidrófobo (LUVs) [69,71]. Confirma-se assim que o complexo OR6 interage com a membrana.

Outro efeito bastante visível é a mudança da progressão vibracional dos espectros do pbt e do OR6 na presença de lípido. Este fenómeno pode ser explicado por estados localmente excitados (LE) e estados de transferência de carga interna (ICT) [69,71]. Depois da excitação pode haver um aumento da separação de cargas dentro do fluoróforo. Se o solvente for polar a espécie com maior separação de cargas (estado ICT) pode tornar-se o estado de menor energia; em solventes menos polares, a espécie sem separação de cargas (LE) pode ter a menor energia [69]. O que é plausível de estar a acontecer nos casos aqui apresentados, e também já descrito num estudo do comportamento da fluorescência de um outro composto (EDAC - (*trans*)-Etil *p*-(dimetilamino)cinamato) em ambientes com diferentes polaridades [97], é uma mudança na natureza do estado emissor, induzida pela mudança de polaridade do meio. Estará a ocorrer emissão a partir de um estado LE na presença de LUVs e a emissão a partir de um estado ICT, mais estável em ambientes de maior polaridade, na ausência de LUVs. Na presença de LUVs o estado ICT aparece a uma energia maior (menores comprimentos de onda) e o LE a uma energia menor, enquanto na ausência de LUVs apenas se observa a banda do estado ICT que se forma rapidamente depois da excitação a partir de um estado LE.

Relativamente ao tempo médio de vida destes dois compostos, há uma diminuição na presença de LUVs de DOPC. Analisando os decaimentos, o que acontece é que na ausência de LUVs estes são descritos por duas exponenciais (emissão a partir de estado LE e ICT) e na presença de LUVs por apenas uma exponencial (emissão apenas a partir do estado LE; nas imagens dos decaimentos em anexo, Figura A. 14, são bem visíveis as diferenças na presença de LUVs). A diminuição do tempo de vida médio na presença de ambientes de polaridade mais

baixa foi também observada para o composto EDAC [97]. Já a intensidade de fluorescência para o ligando pbt aumenta e para o complexo OR6 diminui na presença de LUVs. Na ausência de LUVs o estado ICT é favorecido, uma vez que se trata de um ambiente mais polar. Este estado terá, obrigatoriamente, uma constante radiativa ( $k_r$ ) maior, pois só assim se justifica um maior rendimento quântico e um aumento do tempo de vida médio neste ambiente [69]. Esta explicação aplica-se ao OR6 em que a rotação dos anéis está impedida em solução e na presença de LUVs, dada a coordenação dos ligandos ao centro metálico, fazendo com que a constante não radiativa seja essencialmente a mesma nos dois ambientes. No pbt, o menor tempo de vida médio na presença de LUVs terá uma explicação semelhante à dada para o OR6. No entanto há um aumento do rendimento quântico na presença de LUVs, indicando que a viscosidade do meio terá aqui um efeito maior [69]. Na presença de LUVs as rotações entre a ligação dos anéis do pbt estão impedidas devido à interação com as bicamadas e esta deixa de ser uma via de desativação da excitação da molécula, e, portanto, há um maior rendimento quântico neste ambiente.

Para além de se ter concluído que o OR6 interage com a membrana lipídica, tira-se também a conclusão que essa interação deve ser impulsionada pelo seu ligando pbt, dadas as semelhança de comportamento na presença de LUVs destes dois compostos. Também no complexo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$  é o ligando dppz (e não o *bpy*) o responsável pela localização do complexo no interior da membrana. Por outro lado, o estudo de estabilidade em LUVs indica que o composto se mantém na mesma forma, isto é, não perde nenhum dos seus ligandos. Os elevados valores de  $K_p$  destes compostos também comprovam a forte interação com a bicamada lipídica.

Dos compostos da série II, nesta etapa, apenas foi possível estudar os ligandos Salan usando a sua fluorescência intrínseca. O facto de o aumento de anisotropia destes compostos e o desvio no espectro de emissão não terem sofrido diferenças tão grandes como as observadas para o pbt e o OR6 na presença de LUVs pode ser devido a uma localização diferente destes na membrana. Por exemplo os compostos pbt e OR6 estarão num local mais interior da membrana, e os ligandos Salan mais próxima da interface membrana-água.

Nos espectros de excitação destes ligandos na presença de LUVs, observam-se desvios para o vermelho enquanto nos espectros de emissão se observam desvios para o azul. Em ambiente pouco polares (neste caso nas LUVs) a transição favorecida é do tipo  $n \rightarrow \pi^*$ . Transições deste tipo são desviadas para o azul quando se aumenta a polaridade do solvente (ou seja quando se passa da água para a membrana o desvio é para o vermelho como o observado para estes ligandos). Quando a molécula passa ao estado excitado, há relaxação de solvente e uma inversão na energia das orbitais, passando a transição a ser do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  (em ambiente polares). Esta

transição ocorre mais para o vermelho, como resultado da relaxação do solvente, no entanto há um desvio para o azul quando se passa para as LUVs, uma vez que, neste caso (ambiente pouco polar), a emissão continua a ser do tipo  $n \rightarrow \pi^*$  [71].

O aumento da intensidade de fluorescência destes compostos na presença de LUVs foi observado para estes ligandos. Normalmente as transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  têm um rendimento quântico maior, mas neste caso o maior rendimento quântico é observado em LUVs (transição  $n \rightarrow \pi^*$ ) indicando que o ambiente de maior viscosidade (LUVs) diminui a eficiência das transições não radiativas [71].

Uma outra observação importante é o aumento do rendimento quântico destes ligandos, bem como o aumento do tempo de vida médio na presença das bicamadas. Esta é uma situação bastante comum quando compostos interagem com proteínas ou membranas, uma vez que ficam “protegidos” das moléculas de água que são em muitos casos responsáveis por *quenching* da fluorescência de compostos [69,71]. Daí resulta uma diminuição na constante não radiativa e consequentemente aumento da fluorescência e do tempo de vida médio do estado excitado. Uma outra observação foi que o Salan 4-MeO leva a alterações maiores que o Salan 5-MeO, interpretando essas diferenças em termos de  $K_p$ , para a mesma concentração de lípido (Figura 55) há mais Salan 4-MeO incorporado na membrana que 5-MeO e isso pode resultar nas diferenças observadas para os dois ligandos. Uma última nota deve ser deixada relativamente ao rendimento quântico dos ligandos Salan na presença de LUVs em comparação com o *bpy*. Neste último, a transição tem carácter  $n \rightarrow \pi^*$  completo, ao passo que nos ligandos Salan, pelo facto de os grupos substituintes serem eletrodoadores (metoxi e hidroxil) em que pode haver participação dos eletrões não ligantes na deslocalização, existe sempre algum carácter  $\pi$ . Portanto a diminuição de rendimento por esta razão é menos acentuada que a do *bpy*, resultando, de facto, num aumento de rendimento quântico devido a outros fatores (nomeadamente viscosidade do meio) [71].

Os resultados permitiram concluir que estes ligandos poderão ser os responsáveis pela interação dos compostos S8 e S10 com as bicamadas lipídicas.

O estudo da influência dos compostos nas propriedades da bicamada lipídica através da sonda Di-4-ANEPPS, por um lado serviu para perceber algumas alterações que estes provocam na membrana, como mudanças no potencial de dipolo e na hidratação, mas também permitiu uma melhor elucidação sobre a localização dos compostos na bicamada.

Analisando os resultados obtidos para os compostos da série I as diferenças observadas são apenas ao nível do potencial de dipolo membranar. Razões para este parâmetro se alterar já foram avançadas nesta tese. Também já foram adiantadas possíveis localizações dos compostos na bicamada. No caso dos ligandos *bpy* e *pbt* a sua localização na membrana pode



estar a provocar uma reorganização das cabeças polares dos fosfolípidos, essa situação levará a uma alteração do valor de  $R$ . Por outro lado, se os compostos tiverem uma interação com o interior da membrana, neste caso o valor de  $R$  poderá estar a aumentar devido a uma diminuição da hidratação da bicamada. Como o DOPC apresenta uma bicamada fluida à temperatura ambiente, ao interagir com as bicamadas os ligandos irão preencher o volume livre e, assim diminuir a hidratação. Estas conclusões são apoiadas por outros estudos, tal como já foi mencionado na secção dos resultados [68,99]. Por outro lado, o OR6 um efeito diferente no potencial de dipolo da membrana. Uma vez que este composto contém os ligandos *bpy* e *pbt* na sua estrutura, a sua localização deve ter a influência dos dois. Os estudos apresentados parecem indicar que o *pbt* é o grande responsável pela localização membranar do OR6, mas tendo em conta que este também contém o *bpy*, a sua localização média não deverá ter o efeitos dos seus dois ligandos.

Nos compostos da série II obtiveram-se aumentos do potencial de dipolo na presença de todos os compostos. Uma observação interessante foi que os complexos tinham um menor efeito neste parâmetro do que os ligandos, o que pode ser devido a uma localização diferente na membrana ou até mesmo devido a uma diferença de  $K_p$ , já que os ligandos (Salan 4-MeO e 5-MeO) têm valores de  $K_p$  uma ordem de grandeza superior aos complexos. O valor de  $R$ , também é um parâmetro bastante sensível às ligações hidrogénio [68,99]. Uma redução da hidratação, acompanhada por uma mudança no padrão das ligações hidrogénio com as cabeças polares dos fosfolípidos com grupos como OH e MeO [108] presentes nos ligandos Salan, pode ser também uma das razões do maior aumento do valor de  $R$  na presença destes compostos.

Uma grande diminuição do tempo de vida da sonda Di-4-ANEPPS bem como da sua intensidade de fluorescência (Figura A. 15) na presença dos complexos S8 e S10 indica que um processo de *quenching* estaria a ocorrer. Esta foi uma informação essencial para posteriormente se decidir usar esta sonda para determinar os valores de  $K_p$  destes complexos. Com esse estudo conseguiu-se não só determinar o valor de  $K_p$  mas, também, perceber que estavam a ocorrer processos de *quenching* estático e dinâmico uma vez que o melhor ajuste para o gráfico de *Stern-Volmer* foi uma equação polinomial de segundo grau (pode ver-se em anexo, Figura A. 16, um ajuste para a concentração de 1 mM de lípido).

A ocorrência de *quenching* requer contacto molecular entre o fluoróforo (Di-4-ANEPPS) e o *quencher* (complexo S8 ou S10). Esse contacto pode ser devido a um encontro difusivo (no caso de *quenching* dinâmico), ou devido à formação de um complexo (no caso de *quenching* estático) [69]. Em qualquer dos casos, a extinção de fluorescência do Di-4-ANEPPS indica que a localização do complexo S8 e S10 será próxima da localização do fluoróforo do Di-4-ANEPPS, que se sabe ser na zona da interface membrana/água, correspondendo aproximadamente à região das

cabeças polares dos fosfolípidos (Figura 16 C, secção 1.8). Deste estudo também se percebeu que os complexos S8 e S10 levam a uma diminuição da hidratação da bicamada, previsto quer pelo desvio para o azul no espectro de emissão, quer pelo aumento no valor de R [68].

Os resultados do estudo de estabilidades dos complexos S8 e S10 na presença de LUVs de DOPC representam também uma prova da interação destes compostos com a bicamada. O facto de haver uma menor percentagem de variação no espectro de absorção dos compostos nas primeiras horas na presença de LUVs pode significar que estão a existir interações lípido-complexo que estabilizem os locais de maior reatividade dos complexos.

O facto de não se observarem diferenças nos tamanhos de LUVs de DOPC na presença de compostos significa que a bicamada não está a ser destruída devido à presença destes, não significando contudo que os compostos não estejam a interagir com, e até mesmo a perturbar, as bicamadas. Se a interação for mais superficial, o tamanho das vesículas não vai sofrer alterações notórias e, mesmo que ocorra uma penetração dos compostos para o interior da bicamada, como o DOPC à temperatura ambiente é fluido, tendo uma área por lípido elevada, é previsível também que a incorporação de um composto na bicamada não altere significativamente o seu diâmetro.

Para LUVs de DPPC observam-se diferenças de tamanho na presença de OR6 e pbt. Já se tinha previsto que tanto o OR6 como o pbt têm uma interação forte com a membrana e que a sua localização será no interior da bicamada. Embora os resultados anteriores sejam para DOPC, se os compostos tiverem o mesmo comportamento em DPPC pode-se admitir que este aumento seja devido à incorporação destes compostos nas bicamadas de DPPC. Esse aumento, observado com o complexo OR6, não será devido a agregação de LUVs ou formação de precipitados por parte do complexo, uma vez que a distribuição de tamanhos apresenta apenas uma população independente (Figura A. 12) com diâmetro médio de ca. 120 nm. O DPPC encontra-se na fase gel à temperatura das experiências. Nesta fase, os lípidos encontram-se bastante empacotados, sendo o volume livre muito reduzido, pelo que a inserção dos compostos na bicamada originará a uma expansão desta e um aumento do diâmetro das LUVs, ao contrário do que se observou para o DOPC (bicamada fluida).

Em relação a LUVs de DPPC na presença de pbt, observam-se duas populações distintas no gráfico de distribuição de tamanhos (Figura A. 11), poder-se-ia suspeitar que fosse uma população correspondente a um precipitado do composto ou agregação de LUVs, como já observado por outros [74], caso essa população não aparecesse também no controlo (sem composto), como se pode ver na Figura A. 10. O aparecimento desta segunda população apenas é visível em amostras em que o estudo foi realizado em tampão 2, cuja única diferença relativamente ao tampão 1 é a presença de NaCl. Todos os estudos realizados com o tampão 2

também necessitaram de 2% DMSO. Como em tampão 1 com 2% DMSO não se observa o aparecimento de uma segunda população (Figura A. 13), é de esperar que a nova população será um efeito do NaCl ou um efeito conjunto do DMSO e do NaCl. Será necessário fazerem-se mais estudos para confirmar a origem da segunda população, nomeadamente fazer um estudo do tamanho de LUVs em tampão contendo diferentes concentrações de NaCl, com e sem DMSO.

É comum observar-se que o efeito da carga tem um papel importante na interação de péptidos com as bicamadas lipídicas, através de uma interação electrostática [74,86]. Como os complexos de Ruténio têm carga (OR6 carga 2+ apesar de este ter um contra ião, e S8 e S10 carga +1), poderia acontecer que na interação destes compostos com a bicamada houvesse uma componente electrostática. Por isso estudou-se a influência destes compostos em bicamadas aniónicas (DMPC:DMPG), tanto ao nível do potencial zeta como do tamanho.

Apenas na presença do complexo OR6 houve um aumento do tamanho destas LUVs, apesar de não haver uma alteração no potencial zeta. Isto sugere que a carga poderá facilitar uma interação inicial do composto com as membranas. No entanto, tendo em conta os resultados anteriores e a semelhança nos parâmetros fotofísicos do OR6 e do pbt, conclui-se que o composto acabará por penetrar mais no interior da bicamada devido a interações hidrófobas. Por outro lado este estudo permitiu concluir que nos complexos S8 e S10 uma interação electrostática não favorece a interação com as bicamadas lipídicas.

Ao nível do potencial zeta observou-se uma diminuição deste na presença do ligando Salan 4-MeO e não no ligando Salan 5-MeO. Esta diferença pode ser justificada com base na diferente acidez dos ligandos. No Salan 4-MeO o grupo  $\text{OCH}_3$  (substituinte electrodoador) está na posição *meta* relativamente ao  $\text{O}_{\text{fenólico}}$ , nessa posição a eficiência de doação de eletrões para o anel aromático é mais baixa (comparada com posições *orto* e *para*) e assim a desprotonação do  $\text{O}_{\text{fenólico}}$  acontece a valores de pH mais baixos. Sendo assim, nas mesmas condições, o Salan 4-MeO terá em média mais carga negativa e está a provocar a diminuição do potencial zeta. Dado que a única diferença entre o Salan 4-MeO e o Salan 5-MeO é a posição do grupo MeO, também é evidente que a posição deste substituinte tem influência na interação com a membrana. Este aspeto também tem sido evidenciado pelos restantes estudos descritos neste trabalho.

É comum o aumento da permeabilidade da membrana ser um dos mecanismos de ação de fármacos. Por exemplo o mecanismo de ação antibactericida do péptido rBPI21 começa com a interação deste com a membrana das bactérias rica em PG e o passo final do mecanismo de ação é o aumento da permeabilidade, culminando com a saída do conteúdo bacteriano das células [74]. Um modo de ação semelhante é encontrado para a proteína catiónica presente nos grânulos dos eosinófilos, a MBP. Esta proteína é tóxica para vários tipos de células, incluindo células cancerígenas. Ao início não se sabia se o aumento da permeabilidade provocada por esta

proteína era uma consequência do dano celular ou um efeito principal e um estudo realizado por Kleine T, 1998, mostrou que o aumento da permeabilidade, com consequente aumento do influxo de iões era a causa da morte celular [109]. Os resultados do estudo de permeabilidade mostraram que no caso do OR6 a coordenação dos ligandos ao centro metálico aumenta o efeito de *leakage*, uma vez que os ligandos por si só não têm um efeito significativo na permeabilidade da membrana mas o OR6 aumenta bastante este parâmetro. No entanto, este é um processo bastante lento quando comparado com os outros compostos. Relativamente aos compostos da série II, o ligando Salan 4-MeO mostrou ter um efeito total de *leakage* maior do que Salan 5-MeO. Aqui a posição do grupo MeO pode novamente estar na base dessas diferenças, mas dever-se-á também ter em consideração que o Salan 4-MeO tem um  $K_p$  maior. Aplicando a Equação 19, determinou-se que nas condições da experiência (concentração de lípido 0,5 mM) havia 71% de Salan 4-MeO e apenas 36% de Salan 5-MeO particionados na membrana, o que por si só pode justificar as diferenças observadas no efeito de *leakage* total, mas não no tempo que este demoraram até se obter esse valor de permeabilidade. Desta segunda série de compostos, pode concluir-se que o aumento na permeabilidade da membrana provocada pelos complexos é causado por um efeito médio dos seus ligandos, sendo que o  $PPh_3$  aumenta marcadamente o efeito de *leakage* dos complexos S8 e S10.

Fazendo uma comparação com as propriedades citotóxicas apresentadas pelos compostos e com os resultados aqui obtidos: Apesar do  $K_p$  inferior do Salan 5-MeO, o efeito em R, espectro de emissão e tempo de vida do Di-4-ANEPPS é semelhante ao Salan 4-MeO, tendo em conta o número de moléculas a alteração das propriedades da interface é maior no caso do Salan 5-MeO; Em relação aos complexos o efeito em R também é maior para o S10 do que para o S8. Tanto o complexo S10 como o seu ligando Salan 5-MeO livre, apresentam valores de citotoxicidade superiores em relação a S8/Salan 4-MeO (Tabela 1), assim pode-se dizer que a afinidade para a interface da membrana e a alteração das propriedades de polaridade/hidratação correlacionam-se com a citotoxicidade dos complexos.

## 7 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Este trabalho conduziu a informação crucial sobre a interação de complexos de Ruténio citotóxicos com bicamadas lipídicas simples como modelos de membranas biológicas e, permitiu uma quantificação dessa interação através da determinação da constante de partição membrana/água,  $K_p$ . As bicamadas lipídicas utilizadas permitiram alterações controladas, por exemplo, na compactação e na carga da membrana. No seu conjunto, os resultados deste trabalho mostram que há uma interação forte de todos os complexos com a bicamada lipídica e que a extensão da sua inserção na bicamada depende da identidade e da estrutura dos ligandos.

Há inúmeros estudos na bibliografia que se focam na interação de compostos com bicamadas lipídicas e na forma como os compostos se inserem nela. Um exemplo, é o estudo da quercetina, um flavonoide natural com propriedades farmacológicas, uma delas anticancerígena, e seus derivados. Este estudo mostrou que a formação de ligações de hidrogénio com a cabeça polar dos lípidos influencia a sua localização na bicamada [108]. Este fator, juntamente com fatores como a hidrofiliidade de grupos substituintes, pode fazer aumentar a capacidade de penetração na bicamada. A substituição de um grupo OH por um grupo MeO na quercetina conduziu a uma maior penetração do composto na bicamada [108], embora o grupo OH também fosse responsável por ligações de hidrogénio com a cabeça polar dos lípidos. Em contraste, substituintes como o Cl apresentaram menos tendência para se ligar à cabeça polar dos lípidos [108]. Um outro estudo, realizado com compostos de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  e derivados, em que o ligando dppz (dppz = Dipirido[3,3-a:2',3'-c]-fenazino) era derivatizado com modificações que influenciassem a polaridade, flexibilidade ou tamanho dos compostos, mostrou que esses substituintes (e as modificações introduzidas) têm grande importância para a interação dos compostos com as bicamadas e para a sua localização [98]. Fatores como a carga e a polaridade do ligando mostraram ser fatores importantes para a interação com a região polar dos lípidos. Fatores como a flexibilidade e o carácter hidrófobo influenciam a localização no interior da bicamada [98].

Combinando resultados obtidos com a informação presente noutros estudos podem-se supor conclusões sobre a localização dos compostos (apesar de para as confirmar serem necessários outros estudos, utilizando sondas como o DPH e *t*-PnA ou aplicando métodos de *quenching* diferencial, com grupos extintores localizados a diferentes profundidades da bicamada, nomeadamente fosfolípidos bromados em diferentes posições das cadeias acilo). Resultados como o grande desvio para o azul do espectro de emissão do OR6 e o grande aumento de anisotropia indicam-nos que este composto estará no interior hidrófobo da

bicamada. A grande semelhança de comportamento com o seu ligando pbt e não com o *bpy* indica que será este o responsável pela localização do complexo no interior da membrana. Por outro lado, o facto de na presença da sonda Di-4-ANEPPS não se terem observado diferenças tão grandes como se observou para os complexos S8 e S10, pode significar que este composto se situa na bicamada num local mais distante do fluoróforo da sonda e, portanto, não altera significativamente o tempo de vida desta, nem provoca desvios no seu espectro de emissão. Por outro lado existem estudos com o  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$  que mostram que a sua localização na membrana é mediada pelo seu ligando dppz e não pelo *bpy* o que, também apoia, indiretamente, a conclusão aqui tirada [95].

Em relação aos complexos S8 e S10, a sua localização será um pouco diferente. O facto de no estudo da influência dos ligandos Salan na bicamada não se terem observado diferenças tão grandes como as observadas para o pbt e OR6, foi o primeiro indício de que a localização não seria tão profunda como a do OR6. O facto de os ligandos terem carácter hidrófobo é suficiente para impulsionar uma localização no interior da membrana, mas o facto de terem grupos substituintes OH e MeO, com capacidade para estabelecer ligações hidrogénio com as cabeças polares, faz com que a localização não sejam tão profunda na bicamada. Assim, existem pelo menos dois fatores responsáveis por esta localização mais superficial, ao nível da interface membrana-água. Os resultados obtidos com a sonda Di-4-ANEPPS mostram que os complexos S8 e S10 estarão realmente mais perto da interface membrana-água, uma vez que provocaram *quenching* da fluorescência desta sonda que se sabe localizar aí (Figura 16 C, na secção 1.8).

Os resultados de estabilidade das LUVs e de permeabilidade foram muito importantes. Apesar de não alterarem drasticamente a estabilidade das LUVs, os compostos afetaram muito a permeabilidade da membrana. Isto significa que o aumento da permeabilidade não é uma consequência da destruição do modelo membranar utilizado, mas sim um efeito direto da interação dos compostos com as bicamadas – o que pode estar relacionado com o seu modo de ação. Extrapolando para um caso biológico, uma consequência deste aumento da permeabilidade poderá ser um maior influxo de iões e de água, levando ao *swelling* das células e, eventualmente à lise celular.

Em termos de perspetivas futuras, a sequência natural deste estudo será abordar a interação dos compostos de Ruténio com modelos de membrana mais complexos, que mimetizam de forma mais completa as propriedades das membranas celulares. Nomeadamente modelos contendo jangadas lipídicas, mimetizados por misturas lipídicas com, pelo menos, três lípidos diferentes, sendo um deles o colesterol. Estas são particularmente relevantes no contexto do modo de ação de potenciais metalofármacos pois são domínios especializados da membrana, envolvidos na regulação de vários processos celulares intimamente relacionados

com a cancerigénese [27]. Outros estudos com jangadas lipídicas podem combinar fluorescência em estado estacionário e resolvida no tempo com técnicas de imagiologia, como a microscopia de fluorescência e microscopia de força atómica (AFM) [57,83]. Estas técnicas permitem observar o efeito dos compostos de Ruténio na organização de nanodomínios e de microdomínios.





## 8 BIBLIOGRAFIA

- [1] The World Health Organization website: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>, Acedido a 28 de Agosto de 2013.
- [2] I.J. Fidler, The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited, *Nature Reviews. Cancer*, 3 (2003) 1–6.
- [3] J. Folkman, Role of angiogenesis in tumor growth and Metastasis, *Seminars in Oncology*, 29 (2002) 15–8.
- [4] A.-M. Florea, D. Büsselberg, Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects, *Cancers*, 3 (2011) 1351–71.
- [5] D. Wang, S.J. Lippard, Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4 (2005) 307–20.
- [6] C.X. Zhang, S.J. Lippard, New metal complexes as potential therapeutics, *Current Opinion in Chemical Biology*, 7 (2003) 481–89.
- [7] L. Kelland, The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, *Nature Reviews. Cancer*, 7 (2007) 573–84.
- [8] M.J. Hannon, Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology, *Pure and Applied Chemistry*, 79 (2007) 2243–61.
- [9] M. a Jakupiec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, Antitumour metal compounds: more than theme and variations, *Dalton Transactions*, (2008) 183–94.
- [10] A. Bergamo, C. Gaiddon, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, G. Sava, Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 106 (2012) 90–9.
- [11] S. Page, Ruthenium compounds as anticancer agents, *Royal Society of Chemistry - Education in Chemistry*, (2012) 26–9.
- [12] A. Bergamo, G. Sava, Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy, *Dalton Transactions*, (2007) 1267–72.
- [13] A. Bergamo, G. Sava, Ruthenium anticancer compounds : myths and realities of the emerging metal-based drugs, *Dalton Transactions*, 40 (2011) 7817–23.
- [14] S.H. van Rijt, P.J. Sadler, Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs, *Drug Discovery Today*, 14 (2009) 1089–97.
- [15] F. Santos, Complexos de iões metálicos com interesse na terapia do cancro: Estudos de interacção com biomoléculas, Tese de Mestrado - Faculdade de Ciência da Universidade de Lisboa, 2011.
- [16] C.P. Matos, A. Valente, F. Marques, P. Adão, M. Paula Robalo, R.F.M. de Almeida, J.C. Pessoa, I. Santos, M. Helena Garcia, A.I. Tomaz, New polydentate Ru(III)-Salan complexes: Synthesis, characterization, anti-tumour activity and interaction with human serum proteins, *Inorganica Chimica Acta*, 394 (2013) 616–26.
- [17] O. Domotor, L. Côrte-Real, R.F.M. de Almeida, C.P. Matos, F. Marques, P. Adão, E.A. Enyedy, M.H. Garcia, A.I. Tomaz, On the mechanism of action of anti-tumoral aminophenolate ruthenium(III) complexes, *Artigo Em Preparação*, (2013).

- [18] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9 (2008) 112–24.
- [19] O.S. Andersen, R.E. Koeppe, Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 36 (2007) 107–30.
- [20] L. Vigh, P. V. Escribá, A. Sonnleitner, M. Sonnleitner, S. Piotto, B. Maresca, I. Horváth, J.L. Harwood, The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function, *Progress in Lipid Research*, 44 (2005) 303–44.
- [21] G. Barceló-Coblijn, M.L. Martin, R.F.M. de Almeida, M.A. Noguera-Salvà, A. Marcilla-Etxenike, F. Guardiola-Serrano, A. Lüth, B. Kleuser, J.E. Halver, P. V. Escribá, Sphingomyelin and sphingomyelin synthase (SMS) in the malignant transformation of glioma cells and in 2-hydroxyoleic acid therapy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2011) 19569–74.
- [22] V. Pala, V. Krogh, P. Muti, V. Chajès, E. Riboli, A. Micheli, M. Saadatian, S. Sieri, F. Berrino, Erythrocyte membrane fatty acids and subsequent breast cancer: a prospective Italian study, *Journal of the National Cancer Institute*, 93 (2001) 1088–95.
- [23] X. Meng, N.H. Riordan, H.D. Riordan, N. Mikirova, J. Jackson, M.J. González, J.R. Miranda-Massari, E. Mora, W. Trinidad Castillo, Cell membrane fatty acid composition differs between normal and malignant cell lines, *Puerto Rico Health Sciences Journal*, 23 (2004) 103–6.
- [24] A. Ricci, E. Iorio, F. Podo, Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression: a NMR study, *Biophysics and Bioengineering Letters*, 1 (2008) 1–8.
- [25] J.R. Krycer, A.J. Brown, Cholesterol accumulation in prostate cancer: a classic observation from a modern perspective, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1835 (2013) 219–29.
- [26] B.M. Castro, L.C. Silva, A. Fedorov, R.F.M. de Almeida, M. Prieto, Cholesterol-rich fluid membranes solubilize ceramide domains: implications for the structure and dynamics of mammalian intracellular and plasma membranes, *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (2009) 22978–87.
- [27] P. V. Escribá, J.M. González-Ros, F.M. Goñi, P.K.J. Kinnunen, L. Vigh, L. Sánchez-Magràner, A.M. Fernández, X. Busquets, I. Horváth, G. Barceló-Coblijn, Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12 (2008) 829–75.
- [28] P. V. Escribá, Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine, *Trends in Molecular Medicine*, 12 (2006) 34–43.
- [29] L.M.S. Loura, R.F.M. de Almeida, *Tópicos de biofísica de membranas*, Lidel, Lisboa, 2004.
- [30] M. Edidin, Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4 (2003) 414–18.
- [31] E. Fahy, S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill, R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.S. VanNieuwenhze, S.H. White, J.L. Witztum, E. a Dennis, A comprehensive classification system for lipids, *Journal of Lipid Research*, 46 (2005) 839–61.
- [32] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lipids - Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, United States, 2005.
- [33] A.M. Seddon, D. Casey, R. V. Law, A. Gee, R.H. Templer, O. Ces, Drug interactions with lipid membranes, *Chemical Society Reviews*, 38 (2009) 2509–19.

- [34] D. Hishikawa, H. Shindou, S. Kobayashi, H. Nakanishi, R. Taguchi, T. Shimizu, Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (2008) 2830–5.
- [35] A.G. Lee, How lipids affect the activities of integral membrane proteins, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1666 (2004) 62–87.
- [36] S. Mukherjee, F.R. Maxfield, Membrane domains, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20 (2004) 839–66.
- [37] A. Chabanel, M. Flamm, K.L. Sung, M.M. Lee, D. Schachter, S. Chien, Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity, *Biophysical Journal*, 44 (1983) 171–6.
- [38] R.F.M. de Almeida, L.M.S. Loura, A. Fedorov, M. Prieto, Nonequilibrium phenomena in the phase separation of a two-component lipid bilayer, *Biophysical Journal*, 82 (2002) 823–34.
- [39] H. Cheng, E. London, Preparation and properties of asymmetric large unilamellar vesicles : interleaflet coupling in asymmetric vesicles is dependent on temperature but not curvature, *Biophysical Journal*, 100 (2011) 2671–78.
- [40] G. Vereb, J. Szöllosi, J. Matkó, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Mátyus, T. a Waldmann, S. Damjanovich, Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (2003) 8053–8.
- [41] K. Simons, M.J. Gerl, Revitalizing membrane rafts: new tools and insights, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11 (2010) 688–99.
- [42] J.M. Seddon, R.H. Templer, *Polymorphism of lipid-water systems - Handbook of biological physics*, Elsevier Science, Amsterdam, 1995.
- [43] P.K.J. Kinnunen, On the molecular-level mechanisms of peripheral protein-membrane interactions induced by lipids forming inverted non-lamellar phases, *Chemistry and Physics of Lipids*, 81 (1996) 151–66.
- [44] E.L. Elson, E. Fried, J.E. Dolbow, G.M. Genin, Phase separation in biological membranes: integration of theory and experiment, *Annual Review of Biophysics*, 39 (2010) 207–26.
- [45] J. Henriksen, a C. Rowat, E. Brief, Y.W. Hsueh, J.L. Thewalt, M.J. Zuckermann, J.H. Ipsen, Universal behavior of membranes with sterols, *Biophysical Journal*, 90 (2006) 1639–49.
- [46] C. Huang, S. Li, Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1422 (1999) 273–307.
- [47] A.S. Reddy, D.T. Warshaviak, M. Chachisvilis, Effect of membrane tension on the physical properties of DOPC lipid bilayer membrane, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1818 (2012) 2271–81.
- [48] N. Kucerka, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains, *The Journal of Membrane Biology*, 208 (2005) 193–202.
- [49] T.T. Mills, G.E.S. Toombes, S. Tristram-Nagle, D.-M. Smilgies, G.W. Feigenson, J.F. Nagle, Order parameters and areas in fluid-phase oriented lipid membranes using wide angle X-ray scattering, *Biophysical Journal*, 95 (2008) 669–81.

- [50] Z. V Leonenko, E. Finot, H. Ma, T.E.S. Dahms, D.T. Cramb, Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy, *Biophysical Journal*, 86 (2004) 3783–93.
- [51] Y.-H.M. Chan, S.G. Boxer, Model membrane systems and their applications, *Current Opinion in Chemical Biology*, 11 (2007) 581–7.
- [52] M. Eug, M. Cruz, S. Isabel, M. Lu, B. Maria, F. Martins, Formulation of NPDDS for macromolecules, in: *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*, 2009: pp. 35–49.
- [53] M. Luisa Corvo, J.C.S. Jorge, R. van't Hof, M.E.M. Cruz, D.J. a Crommelin, G. Storm, Superoxide dismutase entrapped in long-circulating liposomes: formulation design and therapeutic activity in rat adjuvant arthritis, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1564 (2002) 227–36.
- [54] H.-T. Cheng, Megha, E. London, Preparation and properties of asymmetric vesicles that mimic cell membranes: effect upon lipid raft formation and transmembrane helix orientation, *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (2009) 6079–92.
- [55] M. Traïkia, D.E. Warschawski, M. Recouvreur, J. Cartaud, P.F. Devaux, Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance, *European Biophysics Journal*, 29 (2000) 184–95.
- [56] D.D. Lasic, The mechanism of vesicle formation, *Biochemical Journal*, 256 (1988) 1–11.
- [57] R.F.M. de Almeida, L.M.S. Loura, M. Prieto, Membrane lipid domains and rafts: current applications of fluorescence lifetime spectroscopy and imaging, *Chemistry and Physics of Lipids*, 157 (2009) 61–77.
- [58] Z. Huang, R.P. Haugland, Partition coefficients of fluorescent probes with phospholipid membranes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 181 (1991) 166–71.
- [59] R. Kaiser, E. London, Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth, *Biochemistry*, 37 (1998) 8180–90.
- [60] J.R. Lakowicz, F.G. Prendergast, Detection of hindered rotations of 1,6 - Diphenyl - 1,3,5 - Hexatriene in lipid bilayers by differential polarized phase fluorometry, *Biophysical Journal*, 24 (1978) 213–27.
- [61] L.M. Loew, Potentiometric dyes: Imaging electrical activity of cell membranes, *Pure and Applied Chemistry*, 68 (1996) 1405–09.
- [62] M. Castanho, M. Prieto, A.U. Acuña, The transverse location of the fluorescent probe trans-parinaric acid in lipid bilayers, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1279 (1996) 164–68.
- [63] L.A. Sklar, The partition of Cis-Parinaric acid and Trans-Parinaric acid among aqueous, fluid lipid, and solid lipid phases, *Molecular & Cellular Biochemistry*, 32 (1980) 169–77.
- [64] F. Aresta-Branco, A.M. Cordeiro, H.S. Marinho, L. Cyrne, F. Antunes, R.F.M. de Almeida, Gel domains in the plasma membrane of *Saccharomyces Cerevisiae*: highly ordered, ergosterol-free, and sphingolipid-enriched lipid rafts, *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (2011) 5043–54.
- [65] L. Wang, Measurements and implications of the membrane dipole potential, *Annual Review of Biochemistry*, 81 (2012) 615–35.
- [66] E. Gross, R.S. Bedlack, L.M. Loew, Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential, *Biophysical Journal*, 67 (1994) 208–16.

- [67] E. Fluhler, V.G. Burnham, L.M. Loew, Spectra, Membrane Binding, and Potentiometric Responses of New Charge Shift Probes, *Biochemistry*, 24 (1985) 5749–5755.
- [68] A.E.P. Bastos, H.S. Marinho, A.M. Cordeiro, A.M. de Soure, R.F.M. de Almeida, Biophysical properties of ergosterol-enriched lipid rafts in yeast and tools for their study: characterization of ergosterol/phosphatidylcholine membranes with three fluorescent membrane probes, *Chemistry and Physics of Lipids*, 165 (2012) 577–88.
- [69] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, New York, 2006.
- [70] A.R. Dias, *Ligação química*, IST Press, Lisboa, 2006.
- [71] B. Valeur, *Molecular fluorescence: Principles and applications*, Wiley-VCH, New York, 2001.
- [72] W.I. Goldberg, Dynamic light scattering, *American Journal of Physics*, 67 (1999) 1152–60.
- [73] N.C. Santos, M. a Castanho, Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of tobacco mosaic virus, *Biophysical Journal*, 71 (1996) 1641–50.
- [74] M.M. Domingues, M. a R.B. Castanho, N.C. Santos, rBPI(21) promotes lipopolysaccharide aggregation and exerts its antimicrobial effects by (hemi)fusion of PG-containing membranes, *PloS One*, 4 (2009) e8385.
- [75] <http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20chapter%2016.pdf>, Acedido a 19 De Junho De 2013, (n.d.).
- [76] J.M. Freire, M.M. Domingues, J. Matos, M.N. Melo, A.S. Veiga, N.C. Santos, M. a R.B. Castanho, Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes, *European Biophysics Journal*, 40 (2011) 481–7.
- [77] B.J. Kirby, E.F. Hasselbrink, Zeta potential of microfluidic substrates: 1 Theory, experimental techniques, and effects on separations, *Electrophoresis*, 25 (2004) 187–202.
- [78] G. Rouser, Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots, *Lipids*, 5 (1969) 494–496.
- [79] R.F.M. de Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts, *Biophysical Journal*, 85 (2003) 2406–16.
- [80] R.C. Macdonald, F.D. Jones, R. Qiu, Fragmentation into small vesicles of dioleoylphosphatidylcholine bilayers during freezing and thawing, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1191 (1994) 362–70.
- [81] L.D. Mayer, M.J. Hope, P.R. Cullis, Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 858 (1986) 161–168.
- [82] R.C. Macdonald, R.I. MacDonald, B.P.M. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao, L. Hu, Small-volume extrusion apparatus for preparation of large unilamellar vesicles, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1061 (1991) 297–303.
- [83] J.T. Marquês, A.S. Viana, R.F.M. De Almeida, Ethanol effects on binary and ternary supported lipid bilayers with gel/fluid domains and lipid rafts, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1808 (2011) 405–14.
- [84] R.F.M. de Almeida, L.M.S. Loura, A. Fedorov, M. Prieto, Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study, *Journal of Molecular Biology*, 346 (2005) 1109–20.

- [85] J. Guillén, A.J. Pérez-berná, M.R. Moreno, J. Villalaín, Identification of the membrane-active regions of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike membrane glycoprotein using a 16/18-Mer Peptide Scan: Implications for the viral fusion mechanism, *Jornal of Virology*, 79 (2005) 1743–52.
- [86] J. Guillén, R.F.M. de Almeida, M. Prieto, J. Villalaín, Structural and dynamic characterization of the interaction of the putative fusion peptide of the S2 SARS-CoV virus protein with lipid membranes, *The Journal of Physical Chemistry*, 112 (2008) 6997–7007.
- [87] N. Santos, Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1612 (2003) 123–35.
- [88] B. de Castro, P. Gameiro, J.L.F. Lima, C. Matos, S. Reis, Location and partition coefficients of anti-inflammatory drugs in EPC liposomes A fluorescence quenching study using n-(9-anthroyloxy)-stearic probes, *Colloids and Surfaces A:Physichomical and Engineering Aspects*, 190 (2001) 205–12.
- [89] F. Gao, H. Chao, F. Zhou, Y.-X. Yuan, B. Peng, L.-N. Ji, DNA interactions of a functionalized ruthenium(II) mixed-polypyridyl complex  $[Ru(bpy)_2ppd]^{2+}$ , *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100 (2006) 1487–94.
- [90] E. Terpetschnig, H. Szmazinski, H. Malak, J.R. Lakowicz, Metal-ligand complexes as a new class of long-lived fluorophores for protein hydrodynamics, *Biophysical Journal*, 68 (1995) 342–50.
- [91] T.A. Immel, U. Groth, T. Huhn, P. Öhlschläger, Titanium salan complexes displays strong antitumor properties in vitro and in vivo in mice, *PloS One*, 6 (2011) e17869.
- [92] A. Vogler, H. Kunkely, Luminescence from Hexacyanoruthenate(III), *Inorganica Chimica Acta*, 53 (1981) 215–216.
- [93] S. Campagna, P. Francesco, G. Bergamini, V. Balzani, Photochemistry and photophysics of coordination compounds: Ruthenium, *Topics in Current Chemistry*, 280 (2007) 117–214.
- [94] L. Zayat, M. Salierno, R. Etchenique, Ruthenium(II) bipyridyl complexes as photolabile caging groups for amines, *Inorganic Chemistry*, 45 (2006) 1728–31.
- [95] X.-Q. Guo, F.N. Castellano, L. Li, J.R. Lakowicz, A long-lifetime Ru(II) metal-ligand complex as a membrane probe, *Biophysical Chemistry*, 71 (1998) 51–62.
- [96] A. Cordeiro, Estudos biofísicos em sistemas modelo da membrana plasmática da levedura, Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2009.
- [97] T. Sanjoy Singh, S. Mitra, Fluorescence behavior of intramolecular charge transfer state in trans-ethyl p-(dimethylamino)cinamate, *Journal of Luminescence*, 127 (2007) 508–14.
- [98] M. Ardhammar, P. Lincoln, B. Nordén, Ligand substituents of ruthenium dipyrrophenazine complexes sensitively determine orientation in liposome membrane, *The Journal of Physical Chemistry*, 105 (2001) 11363–68.
- [99] A. Khemelinskaia, M. Iburguren, R.F.M. de Almeida, D.J. López, V.A. Paixão, H. Ahayayauch, F.M. Goñi, P. Escribá, Membrane order and hydration changes upon spontaneous insertion of 2-hydroxylated unsaturated fatty acids in the lipid bilayer, *Artigo Em Preparação*, (2013).
- [100] A.K. Sum, J.J. de Pablo, Molecular simulation study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipid bilayers, *Biophysical Journal*, 85 (2003) 3636–45.

- [101] Z.E. Hughes, A.E. Mark, R.L. Mancera, Molecular dynamics simulations of the interactions of DMSO with DPPC and DOPC phospholipid membranes, *The Journal of Physical Chemistry*, 116 (2012) 11911–23.
- [102] V.I. Gordeliy, M. a Kiselev, P. Lesieur, a V Pole, J. Teixeira, Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide/water mixtures, *Biophysical Journal*, 75 (1998) 2343–51.
- [103] S. Campagna, F. Puntoriero, F. Nastasi, G. Bergamini, V. Balzani, DMSO-Induced dehydration of DPPC membranes studies by X-RAY, Small-Angle Neutron Scattering, And Calorimetry, *Journal of Alloys and Compounds*, 286 (1999) 195–202.
- [104] A.P. Dabkowska, F. Foglia, M.J. Lawrence, C.D. Lorenz, S.E. McLain, On the solvation structure of dimethylsulfoxide/water around the phosphatidylcholine head group in solution, *The Journal of Chemical Physics*, 135 (2011) 225105–14.
- [105] V.I. Gordeliy, M. a Kiselev, P. Lesieur, a V Pole, J. Teixeira, Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide/water mixtures, *Biophysical Journal*, 75 (1998) 2343–51.
- [106] J. Cladera, P. O'Shea, Intramembrane molecular dipoles affect the membrane insertion and folding of a model amphiphilic peptide, *Biophysical Journal*, 74 (1998) 2434–42.
- [107] A.E.P. Bastos, S. Scolari, A. Khemelinskaia, A.M. Cordeiro, A.M. de Soure, A. Herrmann, H.S. Marinho, R.F.M. de Almeida, Sterol Interactions with sphingolipids and phospholipids in membrane raft formation A comparative study of cholesterol, ergosterol and zymosterol, *Artigo Em Preparação*, (2013).
- [108] R. Sinha, N.K. Gadhwal, U.J. Joshi, S. Srivastava, G. Govil, Modifying effect og quercetin on model biomembranes: Studied by molecular dynamic simulation, DSC and NMR, *Internacional Journal of Current Pharmaceutical Research*, 4 (2012) 70–9.
- [109] T.J. Kleine, G.J. Gleich, S. a Lewis, Eosinophil major basic protein increases membrane permeability in mammalian urinary bladder epithelium, *American Physiological Society*, 275 (1998) C93–C103.





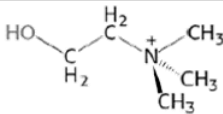
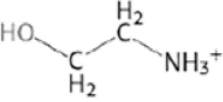
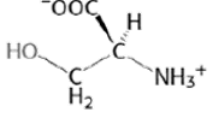
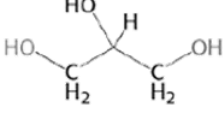
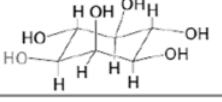
## 9 ANEXOS

### 9.1 Principais grupos polares e apolares em lípidos membranares

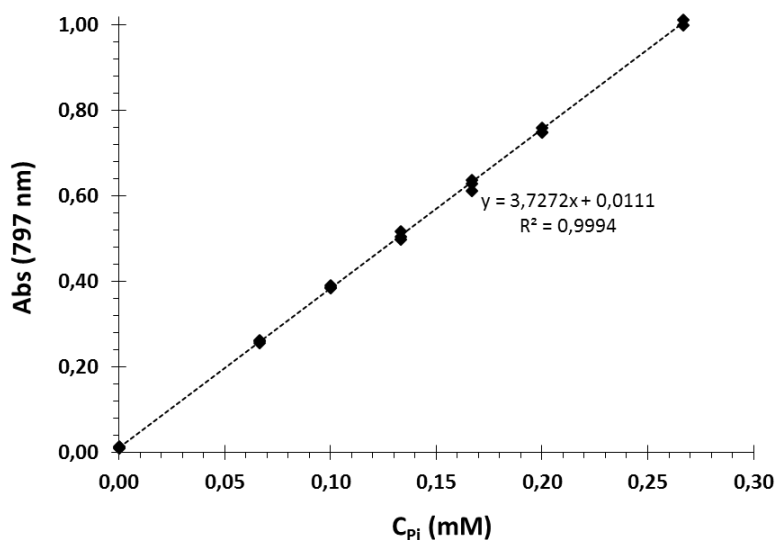
**Tabela A. 1:** Nomes comuns e símbolos para ácidos gordos comuns nas membranas. A nomenclatura indica o número de átomos de carbono e o número de insaturações, separados por dois pontos. Entre parênteses estão representados os locais das duplas ligações. Todos os ácidos aqui indicados têm ligações duplas com configuração *cis* [29].

Nome Comum	Símbolo	Nome Comum	Símbolo
<b>Mirístico</b>	14:0	$\gamma$ - Linolénico	18:3 (6, 9, 12)
<b>Palmitico</b>	16:0	$\alpha$ - Linolénico	18:3 (9, 12, 15)
<b>Palmitoleico</b>	16:1	Araquídico	20:0
<b>Esteárico</b>	18:0	Araquidónico	20:4 (5, 8, 11, 14)
<b>Oleico</b>	18:1 (9)	Behénico	22:0
<b>Linoleico</b>	18:2 (9, 12)	Lignocérico	24:0

**Tabela A. 2:** Representação da estrutura dos grupos polares (X na Figura 8), nome genérico, abreviatura e carga a pH fisiológico dos diferentes glicerofosfolípidos (adaptado de [29]).

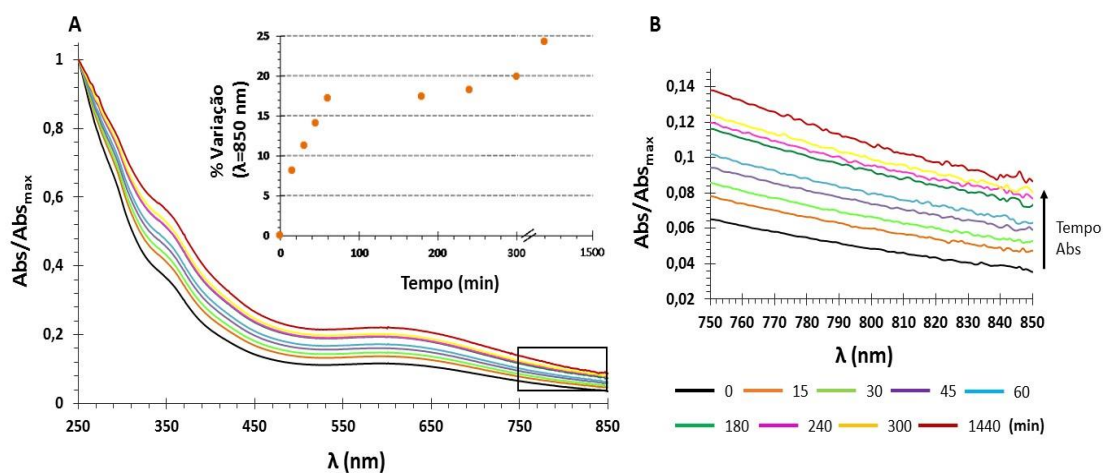
Nome genérico	Abreviatura	Estrutura do grupo X	Carga a pH fisiológico
<b>Ácido fosfatídico</b>	PA	- H	-1
<b>Fosfatidilcolina</b>	PC		0
<b>Fosfatidiletanolamina</b>	PE		0
<b>Fosfatidilserina</b>	PS		-1
<b>Fosfatidilglicerol</b>	PG		-1
<b>Fosfatidilinositol</b>	PI		-1

## 9.2 Doseamento Lipídico

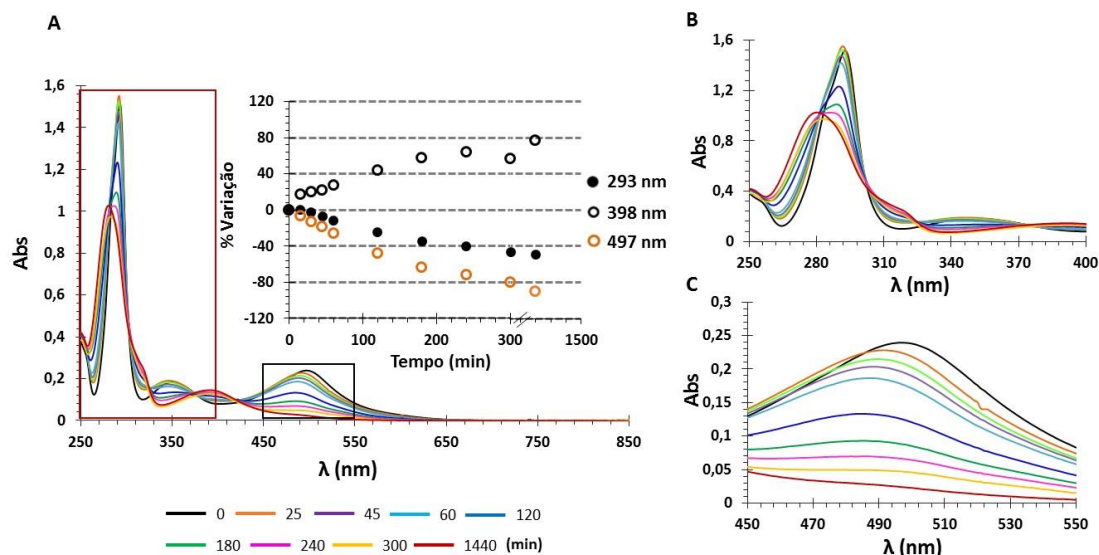


**Figura A. 1:** Exemplo de uma curva padrão obtida para o doseamento lipídico, com representação da absorvência a 797 nm para cada padrão de fosfato, ( $P_i$ ). A linha tracejada representa o ajuste linear ao conjunto dos três pontos para cada concentração de fosfato, ( $C_{Pi}$ ), ( $R^2$  é o coeficiente de determinação da regressão).

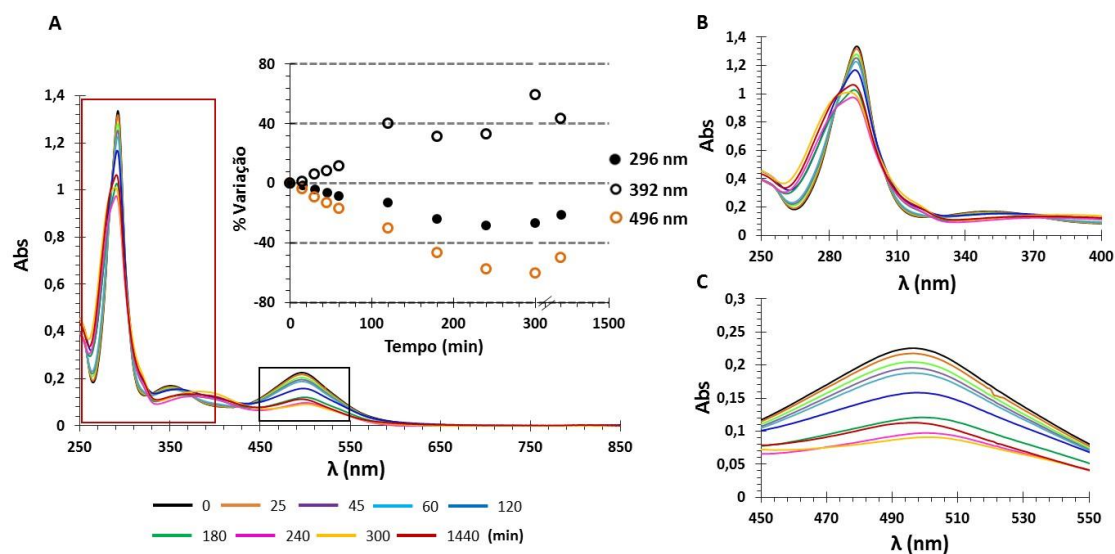
## 9.3 Estudos de estabilidade dos compostos



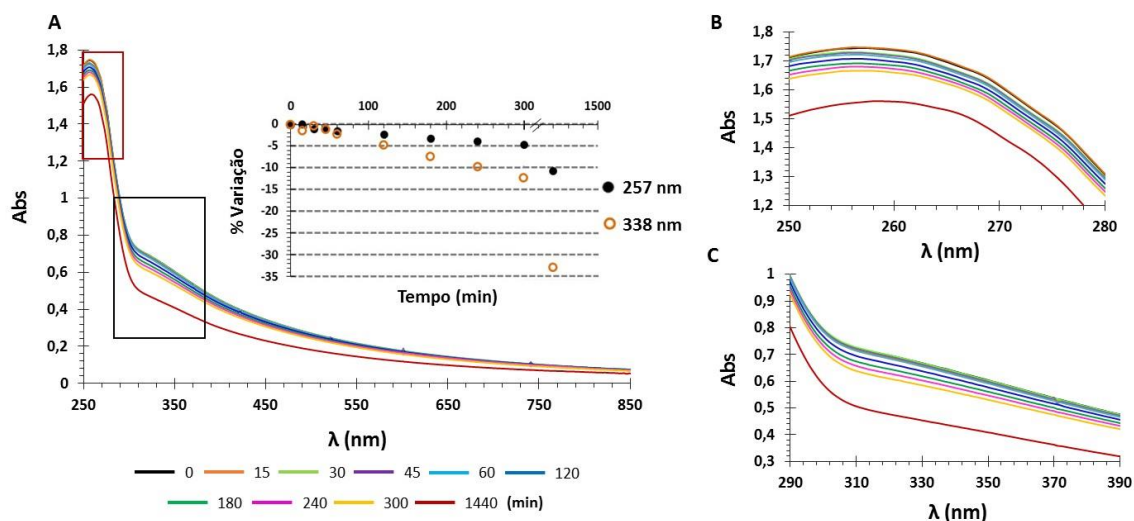
**Figura A. 2:** Estudo de estabilidade do complexo S8,  $C_{S8} = 55 \mu M$ , em tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) com 2% DMSO. **A** – Espectro de absorção UV-Vis normalizado ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 850 nm, onde se pode observar um aumento desta ao longo do tempo; **B** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (750 – 850 nm) onde se observa um aumento da absorvência residual ao longo do tempo, consciente com o aumento da turbidez da solução devido à formação de precipitado. As amostras foram mantidas no escuro entre cada medição.



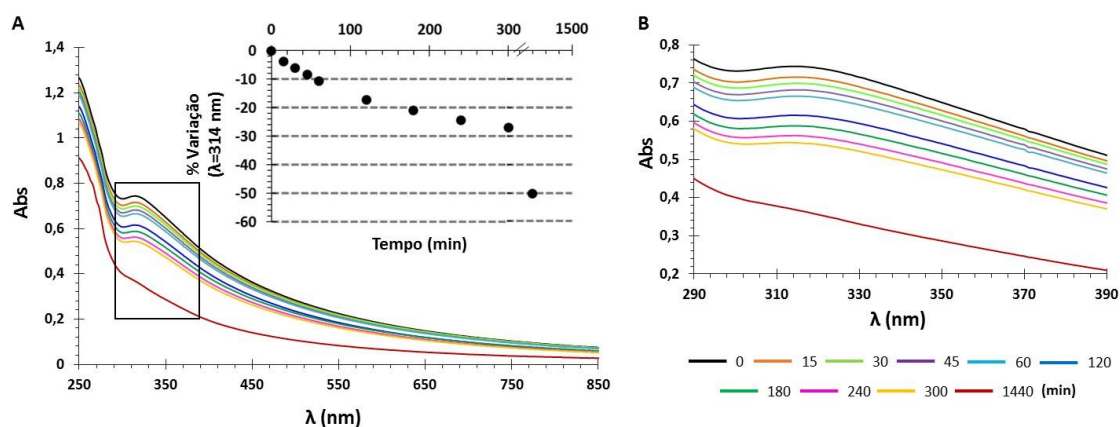
**Figura A. 3:** Estudo de estabilidade do precursor  $[Ru(bpy)_2Cl_2]$ ,  $C_{[Ru(bpy)_2Cl_2]} = 40 \mu M$ , em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) com 2% DMSO. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 292 nm, 398 nm e 497 nm; **B** – Zoom da zona rodeada a vermelho no gráfico A (250 – 400 nm); **C** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (450 – 550 nm).



**Figura A. 4:** Estudo de estabilidade do precursor  $[Ru(bpy)_2Cl_2]$ ,  $C_{[Ru(bpy)_2Cl_2]} = 40 \mu M$ , em tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) com 2% DMSO. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 296 nm, 392 nm e 496 nm; **B** – Zoom da zona rodeada a vermelho no gráfico A (250 – 400 nm); **C** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (450 – 550 nm).

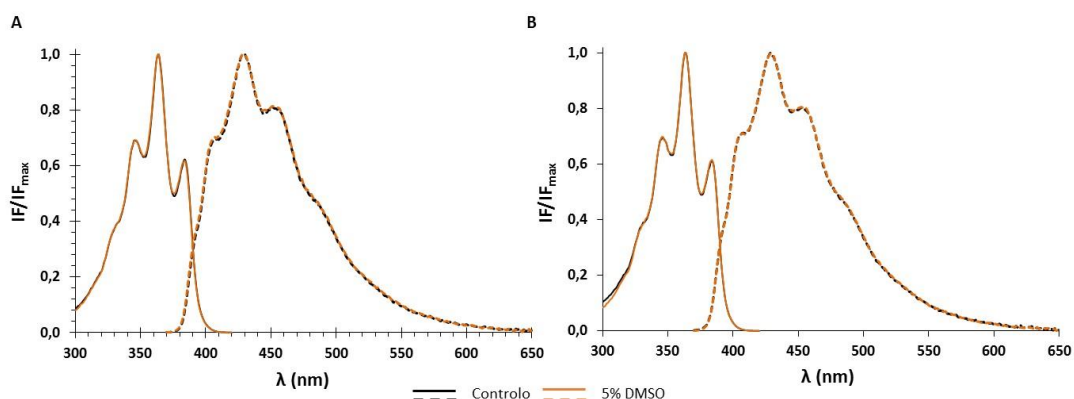


**Figura A. 5:** Estudo de estabilidade do precursor  $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}_2]$ ,  $C_{[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}_2]} = 32 \mu\text{M}$ , em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) com 2% DMSO. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) a 257 nm e 338 nm; **B** – Zoom da zona rodeada a vermelho no gráfico A (250 – 280 nm); **C** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (290 – 390 nm).

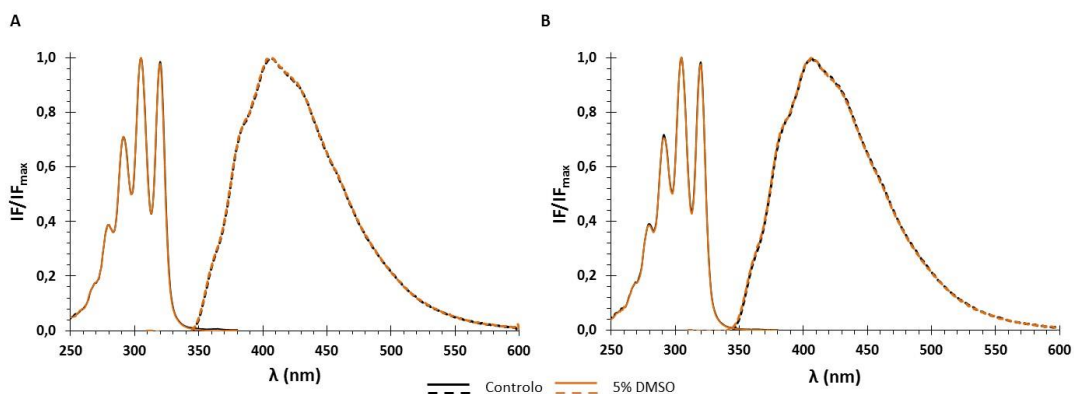


**Figura A. 6:** Estudo de estabilidade do precursor  $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}_2]$ ,  $C_{[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}_2]} = 32 \mu\text{M}$ , em tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) com 2% DMSO. **A** – Espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo (até 1440 min = 24 h) com *inset* da percentagem de variação (Equação 12) ao 314 nm **B** – Zoom da zona rodeada a preto no gráfico A (290 – 390 nm).

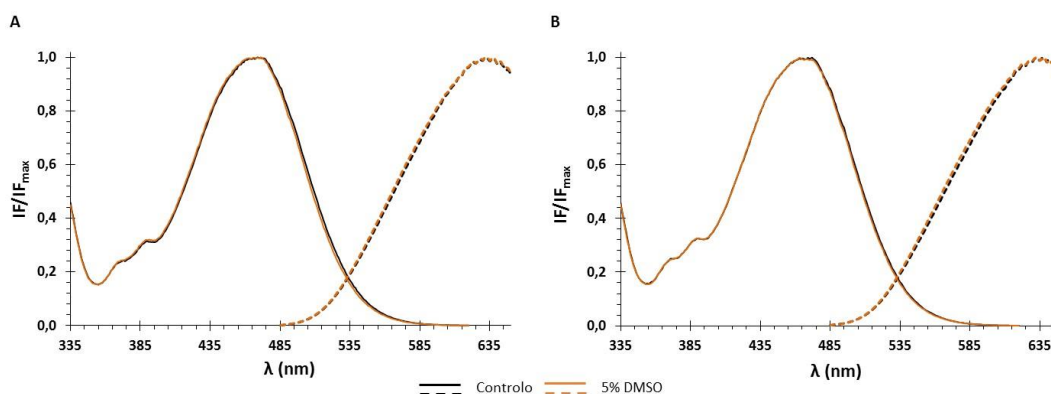
## 9.4 Espectros de excitação e emissão das sondas de membrana usadas no estudo do efeito do DMSO em bicamadas de DPPC



**Figura A. 7:** Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do DPH em LUVs de DPPC, na ausência de DMSO a preto (controle) e na presença de 5% DMSO a laranja: **A** – Estudo realizado com o tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4); **B** - Estudo realizado com o tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM).

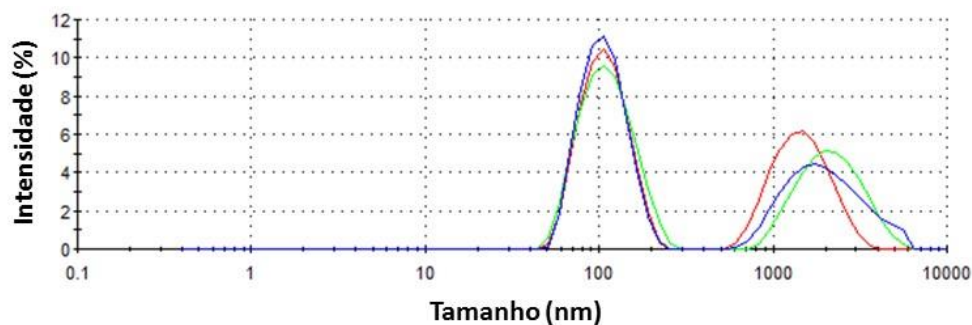


**Figura A. 8:** Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do *t*-PnA em LUVs de DPPC, na ausência de DMSO a preto (controle) e na presença de 5% DMSO a laranja: **A** – Estudo realizado com o tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4); **B** - Estudo realizado com o tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM).

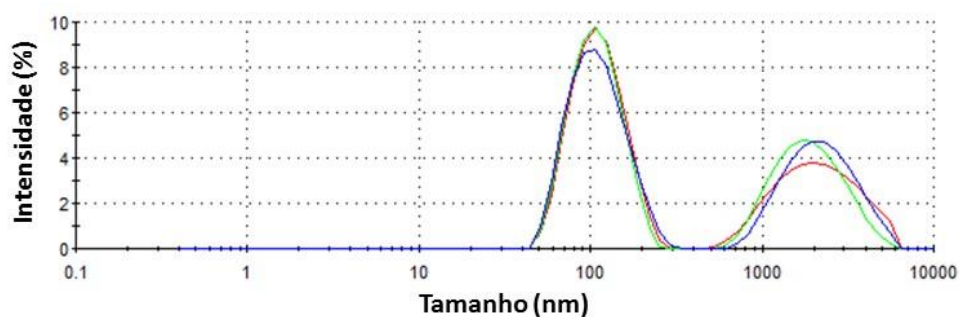


**Figura A. 9:** Espectros normalizados de excitação (linhas cheias) e emissão (linhas tracejadas) do Di-4-ANEPPS em LUVs de DPPC, na ausência de DMSO a preto (controle) e na presença de 5% DMSO a laranja: **A** – Estudo realizado com o tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4); **B** - Estudo realizado com o tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM).

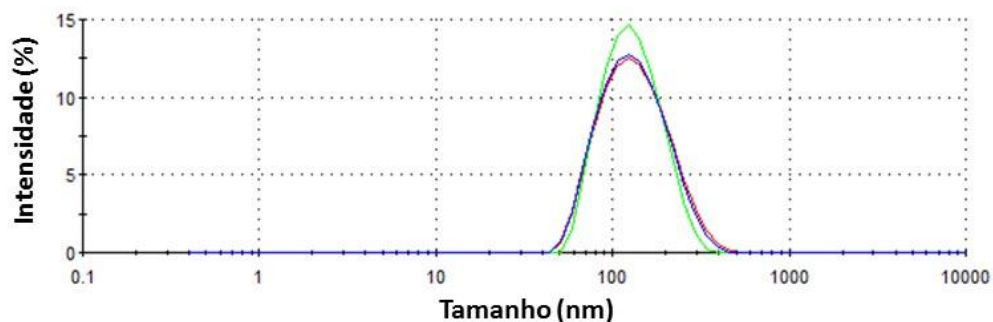
## 9.5 Resultados de *Dynamic Light Scattering*



**Figura A. 10:** Distribuição de tamanhos de LUVs de DPPC suspensas em tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO (**controle**); PI = 0,490. O primeiro pico apresenta uma intensidade de 58,4% e o segundo pico de 41,6%. As diferentes cores representam as três medidas que são realizadas para cada amostra. PI = índice de polidispersão.

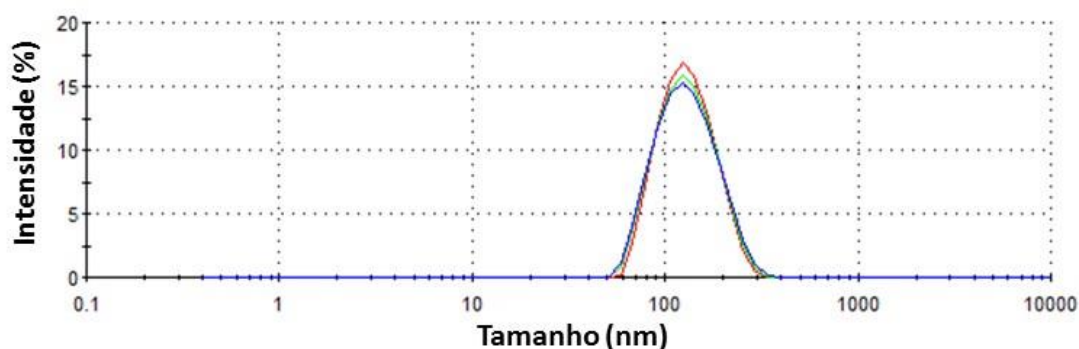


**Figura A. 11:** Distribuição de tamanhos de LUVs de DPPC depois da incubação como ligando **pbt**,  $C_{pbt} = 10 \mu M$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM); PI = 0,641. O primeiro pico apresenta uma intensidade de 60,8% e o segundo pico de 39,2%. As diferentes cores representam as três medidas que são realizadas para cada amostra.



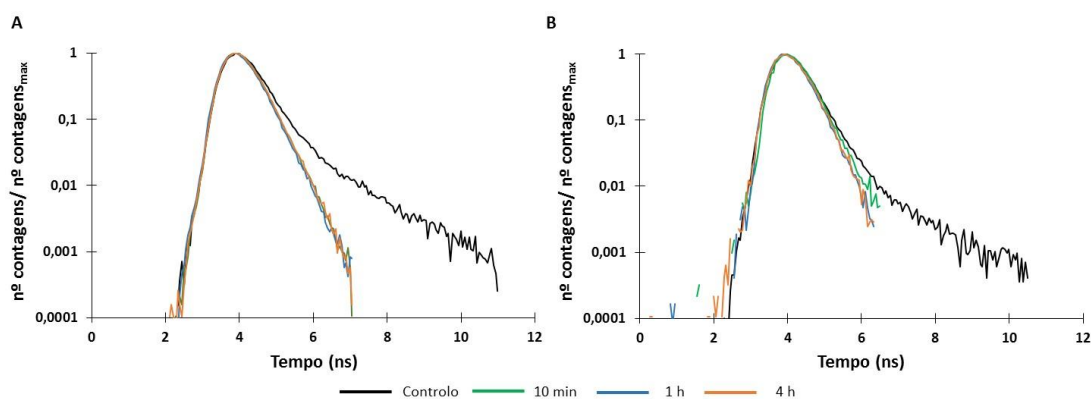
**Figura A. 12:** Distribuição de tamanhos de LUVs de DPPC depois da incubação como complexo **OR6**,  $C_{OR6} = 20 \mu M$ , tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4); PI = 0,144. As diferentes cores representam as três medidas que são realizadas para cada amostra.





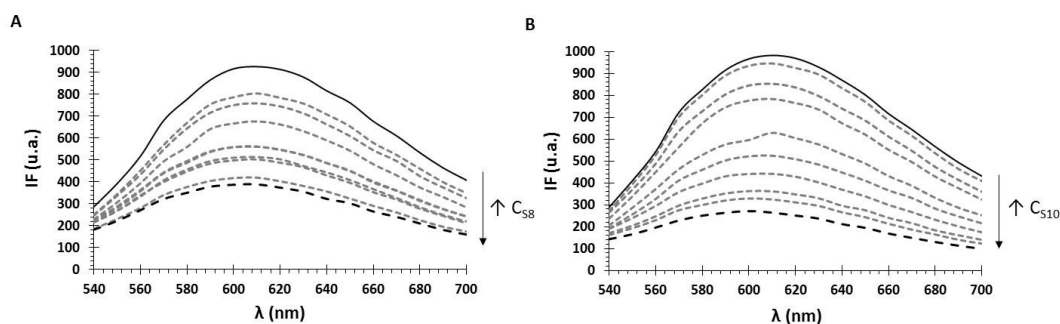
**Figura A. 13:** Distribuição de tamanhos de LUVs de DPPC suspensas em tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4) 2% DMSO (controle); PI = 0,111. As diferentes cores representam as três medidas que são realizadas para cada amostra.

## 9.6 Decaimentos de intensidade de fluorescência

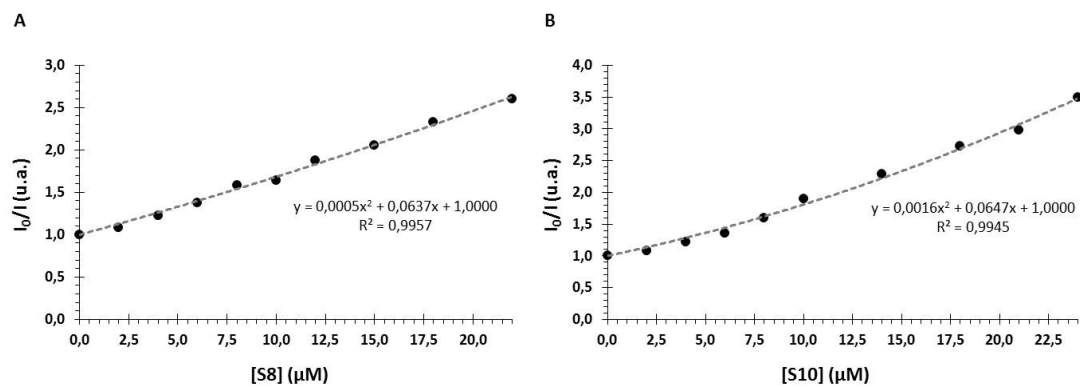


**Figura A. 14:** Decaimentos de intensidade de fluorescência compostos de compostos da série I na ausência (controle - preto) e na presença de LUVs de DOPC com diferentes tempos de incubação do composto (verde – 10 min; azul – 1h; laranja – 4h): **A** – Ligando pbt,  $C_{pbt} = 10 \mu\text{M}$ , tampão 2 (Hepes 10 mM pH 7,4\_NaCl 150 mM) 2% DMSO; **B** - Complexo OR6,  $C_{OR6} = 10 \mu\text{M}$ , tampão 1 (Hepes 10 mM pH 7,4).

## 9.7 Resultados de *quenching* de fluorescência da sonda Di-4-ANEPPS



**Figura A. 15:** Gráficos de emissão de fluorescência da sonda Di-4-ANEPPS em LUVs de DOPC,  $C_{lipídio} = 1,5 \text{ mM}$ , na presença de: **A** – Concentrações crescentes do complexo S8; **B** - Concentrações crescentes do complexo S10.



**Figura A. 16:** Gráficos de *Stern-Volmer* obtidos para o Di-4-ANEPPS na presença de diferentes concentrações de complexo: **A** – S8; **B** – S10. A linha cinzenta a tracejado representa o ajuste polinomial feito aos resultados obtidos.  $R^2$  é o coeficiente de determinação da regressão.